

PCT/US2021/017665

МПК: *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)

ТЕРАПИЯ АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ ВСМА ПРИ АУТОИММУННЫХ РАССТРОЙСТВАХ

В данной заявке на изобретение заявлен приоритет предварительной заявки на патент США № 62/975663, поданной 12 февраля 2020 года, на которую здесь ссылаются.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка на изобретение включает в себя ссылку на машиночитаемую форму (CRF) перечня последовательностей в текстовом формате ASCII. Текстовый файл с перечнем последовательностей, озаглавленный как «14247-482-228_SEQ_LISTING», создан 11 февраля 2021 года, и имеет размер 106995 байт.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лечению или терапии аутоиммунных расстройств, таких как аутоиммунные расстройства, вызванные аутореактивными В-клетками, например, васкулита, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) (AAV).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аутоиммунные расстройства возникают тогда, когда иммунная система субъекта атакует здоровые ткани или органы в организме самого субъекта. В некоторых случаях эти расстройства могут быть результатом аномального распознавания антигенов на собственных тканях субъекта («аутоантигены») В-клетками («аутореактивными В-клетками»), например, В-клетками памяти, плазмбластами и/или плазматическими клетками. В некоторых случаях аутореактивные плазмбласты и плазматические клетки могут продуцировать аутореактивные антитела («аутоантитела»), которые распознают аутоантигены и/или атакуют здоровые ткани или органы, экспрессирующие аутоантигены. Системная красная волчанка (SLE) описана как типичное аутоиммунное расстройство (Fava, A. and Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. Journal of autoimmunity, 96, 1–13).

Васкулит, ассоциированный с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) (AAV), представляет собой тяжелое аутоиммунное расстройство, вызванное аутореактивными В-клетками, которое демонстрирует значительную заболеваемость и

смертность. Пациенты, страдающие от AAV, циклически переходят от активного заболевания к периодам ремиссии варьирующей длительности. Излечение AAV отсутствует, и 50% пациентов умирают или страдают от тяжелых осложнений в период активного заболевания. AAV характеризуется деструктивным воспалением кровеносных сосудов, имеющих размер от мелких до средних, опосредованным аутоантителами ANCA.

Существующие способы лечения аутоиммунных расстройств не всегда являются эффективными для того, чтобы вызывать или поддерживать ремиссию, и/или могут обладать нежелательными побочными действиями. Таким образом, существует потребность в дополнительных способах лечения или терапии аутоиммунных расстройств.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения или терапии субъекта, страдающего от аутоиммунного расстройства, с использованием мультиспецифичных (например, биспецифических) антител, которые связываются с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии аутоиммунного расстройства, где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или терапии, мультиспецифичного (например, биспецифического) антитела, причем мультиспецифичное антитело связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело, которое связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3) для применения в лечении или терапии аутоиммунного расстройства у субъекта (например, человека).

В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство вызвано В-клетками (например, аутореактивными В-клетками). В предпочтительных воплощениях В-клетки, например, аутореактивные В-клетки, представляют собой В-клетки памяти, плазмбласты и/или плазматические клетки.

В некоторых воплощениях аутоиммунное расстройство выбрано из системной красной волчанки, связанной с IgA-нефропатии, связанного с IgG4 заболевания, мембранозной нефропатии, миастении гравис, нейромиелимита зрительного нерва, обыкновенной пузырчатки, активируемого антителами против PAD4 ревматоидного артрита, сенсibiliзированных/преформированных антител в трансплантате солидных органов, синдрома Гийена-Барре (острой воспалительной демиелинизирующей полинейропатии – AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), иммунной тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита и васкулита, ассоциированного с ANCA (антителами к цитоплазме нейтрофилов) (AAV). В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство не представляет собой связанное с IgG4 заболевание. Предпочтительно, аутоиммунное расстройство представляет собой васкулит, ассоциирующийся с ANCA (AAV), системную красную волчанку (SLE) и/или ревматоидный артрит. В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство представляет собой васкулит, ассоциированный с ANCA (AAV), и/или ревматоидный артрит.

В некоторых воплощениях аутоиммунное расстройство является впервые диагностированным (например, впервые диагностированный AAV, SLE или ревматоидный артрит). В некоторых воплощениях аутоиммунное расстройство является рецидивирующим или устойчивым к лечению (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению AAV, SLE или ревматоидный артрит).

В некоторых воплощениях AAV включает заболевания, которые выбраны из группы, состоящей из грануломатоза с полиангиитом (GPA), эозинофильного грануломатоза с полиангиитом (EGPA), микроскопического полиангиита (MPA) и васкулита с поражением почек, ассоциированного с ANCA. В некоторых воплощениях AAV представляет собой грануломатоз с полиангиитом (грануломатоз Вегенера), эозинофильный грануломатоз с полиангиитом, микроскопический полиангиит или васкулит с поражением почек, ассоциированным с ANCA.

В некоторых воплощениях AAV поражает одну или более чем одну из частей организма пациента, выбранную из нервной системы, глаз, носа, сердца, почек, желудка, тонкого кишечника, легких, суставов, мышц и кожи. В некоторых воплощениях AAV выражается наличием проявлений, угрожающих жизни или основным органам,

возможно при котором пациент страдает от диффузного альвеолярного кровотечения (DAH). В других воплощениях AAV локализован без угрожающих органам проявлений.

В некоторых воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в уменьшении уровня плазмабластов. В некоторых воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в индукции ремиссии. В некоторых воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в поддержании ремиссии. В некоторых воплощениях способ приводит в результате к уменьшению уровня плазмабластов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с отсутствием лечения или контрольным лечением.

В некоторых воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в индукции ремиссии. В некоторых воплощениях способ используют для индукции ремиссии, возможно при котором способ приводит в результате к более быстрой индукции ремиссии у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением. В других воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в поддержании ремиссии. В некоторых воплощениях способ используют для поддержания ремиссии, возможно при котором способ в результате приводит к более длительному поддержанию ремиссии у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

В некоторых воплощениях пациент имеет риск развития синдрома высвобождения цитокинов. В некоторых воплощениях способ в результате приводит к уменьшенной частоте синдрома высвобождения цитокинов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

В некоторых воплощениях пациент имеет риск развития инфекции. В некоторых воплощениях способ в результате приводит к уменьшенной частоте инфекции у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

В некоторых воплощениях контрольное лечение представляет собой лечение стероидами (например, глюкокортикоидами), циклофосфамидом, моноклональным антителом против CD20 (например, ритуксимабом), метотрексатом, азатиоприном, микофенолатом, микофенолата мофетиллом, авакопаном, агентами против TNF (фактор некроза опухоли) (например, инфликсимабом, адалимумабом, голимумабом, этанерцептом), антителами против IL6R ((рецептор интерлейкина 6)) (например, тоцилизумабом, сарилумабом), при помощи костимулирующей блокады (например, абатацептом), ингибиторами JAK (янус-киназ) (например, тофацитинибом, барицитинибом) и/или белимумабом, предпочтительно, при котором контрольное лечение представляет собой лечение стероидами, циклофосфамидом или ритуксимабом.

В некоторых воплощениях мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранную из группы:

(а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:23, области CDR2L с SEQ ID NO:24 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(в) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(г) области CDR1H с SEQ ID NO:29, области CDR2H с SEQ ID NO:30, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

(д) области CDR1H с SEQ ID NO:34, области CDR2H с SEQ ID NO:35, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

(е) области CDR1H с SEQ ID NO:36, области CDR2H с SEQ ID NO:37, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33; и

(ж) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18, области CDR2L с SEQ ID NO:19 и области CDR3L с SEQ ID NO:20.

В особенно предпочтительных воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22, область CDR3H с SEQ ID NO:17, область CDR1L с SEQ ID NO:27, область CDR2L с SEQ ID NO:28 и область CDR3L с SEQ ID NO:20.

В некоторых воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

- (а) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:12,
- (б) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:13,
- (в) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:14,
- (г) области VH с SEQ ID NO:38 и области VL с SEQ ID NO:12,
- (д) области VH с SEQ ID NO:39 и области VL с SEQ ID NO:12,
- (е) области VH с SEQ ID NO:40 и области VL с SEQ ID NO:12 или
- (ж) области VH с SEQ ID NO:9 и области VL с SEQ ID NO:11.

В некоторых воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(а) переменную область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и переменную область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14;

(б) переменную область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и переменную область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13; или

(в) вариабельную область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и вариабельную область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11.

В особенно предпочтительных воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает область VH с SEQ ID NO:10 и область VL с SEQ ID NO: 14.

В некоторых воплощениях антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, выбран из группы, состоящей из CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR ζ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2 или CD226. В предпочтительных воплощениях антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, представляет собой CD3.

В предпочтительных воплощениях, мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий вариабельный домен VH, включающий CDR (область, определяющую комплементарность) тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 в виде, соответственно, тяжелой цепи CDR1H, CDR2H и CDR3H, и вариабельный домен VL, включающий CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 в виде, соответственно, легкой цепи CDR1L, CDR2L и CDR3L. В некоторых воплощениях антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент включает область VH с SEQ ID NO:7 и область VL с SEQ ID NO:8.

В некоторых воплощениях мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий вариабельную область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, и вариабельную область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по

меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH с SEQ ID NO:10 и область VL с SEQ ID NO: 14, и антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH с SEQ ID NO:7 и область VL с SEQ ID NO:8.

В некоторых воплощениях мультиспецифичное антитело представляет собой биспецифическое антитело. В предпочтительных воплощениях мультиспецифичное антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с ВСМА и CD3. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело является двухвалентным (например, формат 1+1). В некоторых воплощениях двухвалентное биспецифическое антитело имеет формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда отсутствует Fc). Альтернативно, двухвалентное биспецифическое антитело может иметь формат: Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 (т.е. когда Fc отсутствует). В предпочтительных воплощениях двухвалентное биспецифическое антитело имеет формат Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело является трехвалентным (например, формат 2+1). В предпочтительных воплощениях биспецифическое антитело является трехвалентным и включает два Fab-фрагмента антитела против ВСМА, один Fab-фрагмент антитела против CD3 и один Fc-фрагмент. В некоторых воплощениях трехвалентное биспецифическое антитело имеет формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; или Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-фрагмент отсутствует). Альтернативно, трехвалентное биспецифическое антитело может иметь формат: Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-

фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-фрагмент отсутствует). В предпочтительных воплощениях трехвалентное биспецифическое антитело имеет формат Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА.

В некоторых воплощениях Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1.

В некоторых воплощениях домен CH1 Fab-фрагмента антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации K147E/D и K213E/D (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и соответствующая легкая цепь иммуноглобулина включает домен CL, имеющий аминокислотные модификации E123K/R/H и Q124K/R/H (нумерация в соответствии с Кабатом).

В альтернативных воплощениях домен CH1 Fab-фрагмента антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации A141W, L145E, K147T и Q175E (нумерация в соответствии с нумерацией EU) или их консервативные замены и соответствующая легкая цепь иммуноглобулина включает домен CL, имеющий аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (нумерация в соответствии с Кабатом), или их консервативные замены.

В некоторых воплощениях мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело дополнительно включает Fc-фрагмент. В некоторых воплощениях Fc-фрагмент представляет собой Fc-фрагмент IgG1. В некоторых воплощениях (например, IgG1) Fc-фрагмент включает первую цепь Fc-фрагмента, включающую первые константные домены CH2 и CH3, и вторую цепь Fc-фрагмента, включающую вторые константные домены CH2 и CH3, причем:

- (а) первый домен CH3 включает модификации T366S, L368A и Y407V или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и
- (б) второй домен CH3 включает модификации T366W или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В альтернативных воплощениях (например, IgG1) Fc-фрагмент включает первую цепь Fc-фрагмента, включающую первые константные домены CH2 и CH3, и вторую цепь Fc-фрагмента, включающую вторые константные домены CH2 и CH3, причем:

- (а) первый домен CH3 включает модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и
- (б) второй домен CH3 включает модификации T350V, T366L, K392L и T394W или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В некоторых воплощениях (например, IgG1) Fc-фрагмент включает:

- (а) модификации L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и/или
- (б) модификации D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В дополнительных воплощениях мультиспецифичное (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением включает следующие SEQ ID NO:

1. 83A10-TCVcv: 45, 46, 47 (x2), 48
2. 21-TCVcv: 49, 50, 51 (x2), 48
3. 22-TCVcv: 52, 53, 54 (x2), 48
4. 42-TCVcv: 55, 56, 57 (x2), 48
5. Mab101: 58, 59, 60 (x2), 48
6. Mab102: 61, 62, 63 (x2), 48
7. Mab103: 64, 65, 66 (x2), 48

В предпочтительных воплощениях биспецифическое антитело в соответствии с изобретением представляет собой 42-TCVcv, Mab101 или Mab102. В особенно предпочтительных воплощениях биспецифическое антитело в соответствии с изобретением представляет собой 42-TCVcv.

Аспекты и воплощения в соответствии с изобретением изложены в формуле изобретения. Эти и другие аспекты, и воплощения изобретения также описаны здесь.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Настоящее изобретение далее будет описано более подробно со ссылкой на приложенные графические материалы, в которых:

На **Фиг. 1** показаны различные форматы биспецифических двухвалентных антител для применения в настоящем изобретении, которые включают Fab-фрагменты, связывающиеся с Т-клеточным антигеном (проиллюстрирован CD3) и ВСМА в формате Fab-фрагмент ВСМА- Fc-фрагмент - Fab-фрагмент CD3. Fab-фрагменты антител против CD3 могут включать кроссовер VH-VL для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи и образования побочных продуктов. Аминокислотные замены (проиллюстрированы «RK/EE») могут быть введены в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/образования побочных продуктов. Fab-фрагменты антител против CD3 и Fab-фрагменты антител против ВСМА могут быть связаны друг с другом гибкими линкерами.

На **Фиг. 2** показаны различные форматы биспецифических трехвалентных антител для применения в настоящем изобретении, которые включают Fab-фрагменты, связывающиеся с Т-клеточным антигеном (проиллюстрирован CD3) и ВСМА в следующих форматах: Fab-фрагмент ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент CD3 - Fab-фрагмент ВСМА (A,B); Fab-фрагмент ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент ВСМА - Fab-фрагмент CD3 (C,D). Fab-фрагменты антител против CD3 могут включать кроссовер VH-VL для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи и образования побочных продуктов. Аминокислотные замены (проиллюстрированы «RK/EE») могут быть введены в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/образования побочных продуктов. Fab-фрагменты антител против CD3 и Fab-фрагменты антител против ВСМА могут быть связаны друг с другом гибкими линкерами.

На **Фиг. 3** показаны дополнительные форматы биспецифических двухвалентных антител для применения в настоящем изобретении, которые включают Fab-фрагменты, связывающиеся с Т-клеточным антигеном (проиллюстрирован CD3) и ВСМА в следующих форматах: Fc-фрагмент - Fab-фрагмент CD3 - Fab-фрагмент ВСМА (A,B); Fc-фрагмент - Fab-фрагмент ВСМА - Fab-фрагмент CD3 (C,D). Fab-фрагменты антител против CD3 могут включать кроссовер VH-VL для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи и образования побочных продуктов. Аминокислотные замены (проиллюстрированы «RK/EE») могут быть введены в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/образования побочных продуктов. Fab-фрагменты антител против CD3 и Fab-фрагменты антител против ВСМА могут быть связаны друг с другом гибкими линкерами.

На **Фиг. 4** показана экспрессия ВСМА в плазмаблестах (PB) четырех нормальных здоровых доноров (NHV) по сравнению с экспрессирующими ВСМА линиями раковых клеток (JEKO, RPMI-8226 и H929), оцененная путем проточной цитометрии (A). Уровни растворимого ВСМА представлены в образцах сыворотки или плазмы крови NHV («нормальные»), пациентов, страдающих от множественной миеломы («ММ») или пациентов, страдающих от васкулита, ассоциированного с ANCA («AAV») (B), оцененные при помощи ELISA (иммуноферментного анализа).

На **Фиг. 5** показаны кривые зависимости ответа от дозы для опосредованного Т-клетками уничтожения (A) и Т-клеточной активации (B), когда клетки JEKO выращивали с CD3⁺ Т-клетками в отношении 1:2 мишень: эффектор (T:E) и обрабатывали биспецифическими антителами против ВСМА и против CD3, т.е. ВСМА привлекающие Т-клетки активаторы (CC-93269, Mab101 или Mab102). Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток JEKO оценивали при помощи экспрессии аннексина V; представлен момент времени через 20 часов. Линию Т-клеток и активацию маркеров анализировали при помощи проточной цитометрии через 24 часа; Представлен % экспрессии CD69 на CD8⁺ Т-клетках.

На **Фиг. 6** показаны кривые зависимости ответа от дозы для опосредованного Т-клетками уничтожения (A) и Т-клеточной активации (B), когда клетки RPMI-8226 выращивали вместе с NHV PBMC при различных отношениях мишень:эффектор (T:E) и различных концентрациях CC-93269.

На **Фиг. 7** показаны кривые зависимости ответа от дозы для уничтожения плазмабластов (A), Т-клеточной активации (C) и продукции цитокинов (D), когда мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здоровых добровольцев обрабатывали различными концентрациями ВСМА привлекающих Т-клетки активаторов, т.е. ВСМА TCE (Mab101, CC-93269 или Mab102) или контрольным антителом 2+1 в течение 24 часов. Типичный график FACS (флуоресцентный сортинг) демонстрирует идентификацию плазмабластов как CD20(-) CD27(+), гейтированных на CD3(-) CD19(+) клетках (B). Уничтожение плазмабластов оценивали как процентную долю относительно всех клеток CD19(+) (A). Представлен % экспрессии CD69 на CD8⁺ Т-клетках (C).

На **Фиг. 8** показаны кривые зависимости ответа от дозы для продукции цитокинов (IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, гранзим В и перфорин), когда РВМС здоровых добровольцев обрабатывали различными концентрациями СС-93269 в течение 24 часов.

На **Фиг. 9** показана линия В-клеток, когда РВМС здоровых добровольцев обрабатывали различными концентрациями СС-93269 в течение 24 часов. Наивные В-клетки с экспрессией CD20(+)CD27(-)IgD(+) (А), некоммутированные В-клетки памяти с экспрессией CD20(+)CD27(+)IgD(+) (В) и коммутированные В-клетки памяти с экспрессией CD20(+)CD27(+)IgD(-) (С) приведены в виде процентной доли относительно общего количества клеток CD19(+).

На **Фиг. 10** показаны кривые зависимости ответа от дозы для уничтожения плазмбластов (А) и Т-клеточной активации (В), когда мононуклеарные клетки костного мозга (ВМ) обрабатывали СС-93269 в течение 24 часов по сравнению с РВМС (мононуклеарные клетки периферической крови), суспендированными в средах, или РВМС, суспендированными в супернатанте костного мозга (ВМ). Уничтожение плазмбластов оценивали в виде процентной доли относительно общего количества клеток CD19(+) (А). Представлен % экспрессии CD69 на CD8+ Т-клетках (В).

На **Фиг. 11** показаны кривые зависимости ответа от дозы для уничтожения плазмбластов (А), Т-клеточной активации (С) и продукции цитокинов (D), когда РВМС пациентов ААV обрабатывали различными концентрациями ВСМА ТСЕ (Mab101, СС-93269 или Mab102) или контрольным антителом 2+1 в течение 24 часов. Типичный график FACS демонстрирует идентификацию плазмбластов как CD20(-) CD27(+), гейтированных на клетках CD3(-) CD19(+) (В). Уничтожение плазмбластов оценивали в виде процентной доли относительно общего количества клеток CD19(+) (А). Представлен % экспрессии CD69 на CD8+ Т-клетках (С).

На **Фиг. 12** показана Т-клеточную активацию в РВМС пациента с ААV, ААV1, при инкубации с ВСМА ТСЕ (Mab101 [А], СС-93269 [В] или Mab102 [С]) в течение 24 часов, оцениваемую путем окрашивания линии Т-клеток (CD4, CD8) и активации маркеров (CD69, CD25). Представлены % уровней экспрессии CD69 или % уровней экспрессии CD25 на клетках CD4+ или клетках CD8+.

На **Фиг. 13** показано избирательное истощение плазмбластов (РВ) в РВМС пациента ААV, ААV-5, который получал ритуксимаб в течение последних 5 месяцев

перед инкубацией и после нее с различными концентрациями СС-93269 (В, С) или контрольным антителом 2+1 (А).

На **Фиг. 14** показаны мишени CD19(+) CD20(-) CD27(+) плазмабластов (А) и CD4(+)/CD8(+) Т-клеток у субъекта ААV-2 на базовом уровне (А). РВМС у ААV-2 инкубировали с различными концентрациями ВСМА ТСЕ и после инкубации в течение 24 часов Т-клеточную активацию оценивали путем проточной цитометрии (С).

На **Фиг. 15** показаны кривые зависимости ответа от дозы для Т-клеточной активации, когда клетки JEKO-1 при различных отношениях Т:Е инкубировали с СС-93269 или контрольным антителом 2+1. Клетки JEKO-1 выращивали с РВМС при отношениях Т:Е 1:10 или 1:500 для имитации отношений Т:Е, обнаруженных, соответственно, при множественной миеломе (ММ) или ААV. После инкубации в течение 24 часов клетки промывали, и затем оценивали экспрессию CD69 (А) и CD25 (В) на CD8(+) Т-клетках.

На **Фиг. 16** показаны уровни плазмабластов (А) и общая секреция IgG (В), когда РВМС здоровых добровольцев инкубировали с различными концентрациями ВСМА ТСЕ в течение 24 часов перед стимулированием ODN2006 (СрG, 10 мкг/мл), или выращивали с факторами роста IL-2 (20 Е/мл), BAFF (200 нг/мл) и IL-21 (100 нг/мл) в течение 4-7 суток.

На **Фиг. 17** показаны кривые зависимости ответа от дозы для уничтожения плазмабластов (А), Т-клеточной активации (В) и продукции цитокинов (С), когда РВМС пациентов, страдающих от ревматоидного артрита (РА), обрабатывали различными концентрациями СС-93269 или контрольным антителом 2+1 в течение 24 часов.

На **Фиг. 18** показана линия В-клеток РВМС пациентов, страдающих от РА, после инкубации с различными концентрациями СС-93269 в течение 24 часов. Наивные В-клетки с экспрессией CD20(+)CD27(-)IgD(+) (А), некоммутированные В-клетки памяти с экспрессией CD20(+)CD27(+)IgD(+) (В) и коммутированные В-клетки памяти с экспрессией CD20(+)CD27(+)IgD(-) (С) приведены в виде процентной доли относительно всех клеток CD19(+).

На **Фиг. 19** показано избирательное истощение плазмабластов IRF4+ (РВ) в РВМС яванского макака после инкубации с различными концентрациями СС-93269 или контрольным антителом 2+1 (А) с минимальным истощением CD20(+) В-клеток (В) и минимальным увеличением частоты активированных CD69(+)CD8(+) Т-клеток (С).

На **Фиг. 20** показаны кривые зависимости ответа от дозы для уничтожения плазмбластов (А) и Т-клеточной активации (В), когда РВМС пациентов, страдающих от системной красной волчанки (SLE) (n=5) обрабатывали различными концентрациями СС-93269 в течение 24 часов.

На **Фиг. 21** показано действие экзогенного растворимого ВСМА (sBCMA) на уничтожение плазмбластов (А) и Т-клеточную активацию (В), когда РВМС нормальных здоровых добровольцев обрабатывали СС-93269 в течение 24 часов.

На **Фиг. 22** показаны кривые зависимости ответа от дозы для Т-клеточной активации (А) и продукции цитокинов (В), когда образцы цельной крови нормальных здоровых добровольцев (n=4) или пациентов, страдающих от ААV (n=2), обрабатывали различными концентрациями СС-93269 в течение 24 часов.

На **Фиг. 23** показаны типичные наложения хроматограмм SEC (гель-фильтрационная хроматография) молекулы 22-ТСВсv после хранения в условиях, приведенных в примере 18.3.3.

На **Фиг. 24** показано термическое разворачивание биспецифических антител Mab101, Mab102, 83A10-ТСВсv и 22-ТСВсv. Все биспецифические антитела демонстрировали похожие начальные температуры термического разворачивания (приблизительно 60°C). Тем не менее, величины T_{mapp} для самого большого перехода были на 5°C больше для молекул Mab101 и 83A10-ТСВсv, включающих общие области CDR.

На **Фиг. 25** показана оценка коллоидной стабильности для биспецифических антител Mab101, Mab102, 83A10-ТСВсv и 22-ТСВсv. Оценку осуществляли путем осаждения при помощи PEG (полиэтиленгликоль) 6000 в буфере с pH 6. Молекула, включающая области CDR 83A10 (т.е. Mab101 и 83A10-ТСВсv), требовала почти вдвое больше PEG 6000 для того, чтобы вызвать осаждение в нативном состоянии путем исключения объемных эффектов. Сплошные линии подогнаны к уравнению 1.

На **Фиг. 26** показана типичная сенсограмма кинетики для одного цикла SPR для биспецифического антитела 83A10-ТСВсv. Антитело забуферивали при pH 6 и хранили в течение двух недель при 2-8°C (А) или забуферивали при pH 8 и хранили в течение двух недель при 40°C (В). Пунктирная линия демонстрирует среднюю величину для 10 независимых измерений для образца перед хранением, не подвергнутого воздействию стрессовыми факторами, и точечные линии указывают на 3 стандартных отклонения

(SD) относительно этой средней величины. Процентные оценки близости рассчитывали с использованием множества точек данных для подвергнутых воздействию стрессовых факторов образцов, которые находятся в пределах диапазона SD в соответствии с уравнением 2.

Фиг. 27 представляет собой совмещение последовательностей биспецифических антител Mab101, Mab102, 83A10-TCVcv и 22-TCVcv. Области CDR заштрихованы и процентная доля идентичности последовательностей представлена выше.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Используемые здесь артикли «а» и «an» могут относиться к одному или более чем одному (например, по меньшей мере к одному) грамматическому объекту артикля.

«Приблизительно» как правило может означать допустимую степень ошибки количественной величины, измеряемой с учетом ее природы или точности измерений. Примеры степени ошибки находятся в пределах 20 процентов (%), как правило, в пределах 10%, и конкретней, в пределах 5% от заданной величины или диапазона величин.

Воплощения, раскрытые здесь как «включающие» одно или более чем одно из свойств, также могут рассматриваться как описание соответствующих воплощений, «состоящих из» и/или «по существу состоящих из» таких свойств.

Концентрации, количества, объемы, процентные доли и другие числовые величины могут быть представлены здесь в формате диапазона. Также понятно, что такой формат диапазона используют исключительно для удобства и лаконичности, и он должен быть интерпретирован гибким образом, как включающий не только числовые величины, явно обозначающие пределы диапазона, а также включающие все отдельные числовые величины или поддиапазон, включенный в этот диапазон, как если бы каждая числовая величина и поддиапазон были обозначены явным образом.

Терапевтические способы

Изобретение основано, по меньшей мере частично, на лечении или терапии субъекта, страдающего от аутоиммунного расстройства, при помощи мультиспецифических (например, биспецифических) антител, которые связываются с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3), и ВСМА.

В некоторых воплощениях термин «субъект» или «пациент» представляет собой человека. В некоторых воплощениях «субъект» или «пациент» имеет возраст менее 18 лет. В некоторых воплощениях «субъект» или «пациент» имеет возраст 18 лет или старше. В некоторых воплощениях субъект нуждается в индукции ремиссии. В некоторых воплощениях субъект нуждается в поддержании ремиссии. В некоторых воплощениях пациент представляет собой пациента, нуждающегося в уменьшении уровня плазмбластов.

Использованные здесь термины «лечить», «проводить лечение» или «лечение» и т.п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического действия. Предпочтительно, действие является терапевтическим, т.е., действие частично или полностью лечит заболевание и/или неблагоприятный симптом, связанный с заболеванием. Альтернативно, фармакологическое и/или физиологическое действие может быть профилактическим, т.е. действие полностью или частично предупреждает заболевание или его симптом.

Использованные здесь термины «проводить терапию», «процесс проведения терапии» или «терапия» и т.п. относятся к подавлению и/или замедлению прогресса и/или ухудшения заболевания и/или неблагоприятных симптомов, связанных с заболеванием.

Настоящее изобретение относится к лечению или терапии аутоиммунного расстройства мультиспецифичными (например, биспецифическими) антителами, которые связываются с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3) и ВСМА.

В некоторых воплощениях мультиспецифичные (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением способны избирательно связываться с клетками, вызывающими аутоиммунное расстройство, например, с клетками, экспрессирующими ВСМА, вызывающими аутоиммунное расстройство.

В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство вызвано В-клетками (например, В-клетками, экспрессирующими ВСМА). В некоторых воплощениях В-клетки (например, В-клетки, экспрессирующие ВСМА) представляют собой аутореактивные В-клетки. В некоторых воплощениях В-клетки (например, В-клетки, экспрессирующие ВСМА) способствуют аутоиммунитету, например, путем

того, что служат в качестве антигенпрезентирующих клеток, или посредством секреции провоспалительных цитокинов.

Использованный здесь термин «аутореактивные В-клетки» относится к В-клеткам, способным распознавать антигены в собственных тканях субъекта («аутоантигены»). Аутореактивные В-клетки могут представлять собой клетки, секретирующие антитело и/или которые могут быть способны секретировать антитела. В некоторых воплощениях аутореактивные В-клетки представляют собой плазмабласты, плазматические клетки, В-клетки памяти или любую их комбинацию. В предпочтительных воплощениях аутореактивные В-клетки представляют собой плазмабласты, плазматические клетки и В-клетки памяти. В особенно предпочтительных воплощениях аутореактивные В-клетки представляют собой плазмабласты.

В некоторых воплощениях мультиспецифичные (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением способны избирательно связываться с аутореактивными В-клетками, вызывая аутоиммунное расстройство. В предпочтительных воплощениях аутореактивные В-клетки представляют собой клетки, экспрессирующие ВСМА, такие как В-клетки памяти, плазмабласты и/или плазматические клетки.

Плазмабласты представляют собой предшественники плазматических клеток. Они могут быть идентифицированы путем комбинации одного или более чем одного из маркеров, выбранных из CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD38(+), ВСМА(+), IgD(-), CD24(-), SLAMF7(+) и/или CD138(-). В некоторых воплощениях плазмабласты идентифицируют как клетки, демонстрирующие ВСМА(+) и SLAMF7(+), возможно причем клетки также демонстрируют один или более чем один из маркеров IgD(-), CD38(+) и/или CD138(-). В некоторых воплощениях плазмабласты идентифицируют как клетки, демонстрирующие CD19(+) CD20(-) CD27(+) ВСМА(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-). В особенно предпочтительных воплощениях плазмабласты идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры CD19(+) CD20(-) CD27(+), возможно причем клетки также демонстрируют один или более чем один из маркеров ВСМА(+) и/или CD38(+).

Плазматические клетки представляют собой клетки, секретирующие антитело. Использованный здесь термин «плазматические клетки» может относиться к короткоживущим и/или длительно живущим плазматическим клеткам. Они могут быть

идентифицированы путем комбинации одного или более чем одного из маркеров, выбранных из CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD38(+), BCMA(+), IgD(-), CD138(+), CD24(-) и/или SLAMF7(+). В некоторых воплощениях плазматические клетки идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры BCMA(+) SLAMF7(+) CD138(+), возможно причем клетки также демонстрируют один или более чем один из маркеров IgD(-) и/или CD38(+). В некоторых воплощениях плазматические клетки идентифицируют как клетки, демонстрирующие CD19(+) CD20(-) CD27(+) BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(+). В особенно предпочтительных воплощениях плазматические клетки идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры CD19(+) CD20(-) CD27(+), возможно причем клетки также демонстрируют один или более чем один из маркеров BCMA(+) CD38(+) и/или CD138(+).

В-клетки памяти представляют собой В-клетки, активированные антигенами и Т-клеточными хэлперами во внефолликулярных или GC реакциях. Они могут быть идентифицированы путем комбинации одного или более чем одного из маркеров, выбранных из CD19(+), CD20(+), CD27(+), CD38(-), BCMA(+/-), IgD(-) и/или CD24(+). В некоторых воплощениях В-клетки памяти идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры IgD(-) CD38(-) BCMA(+/-). В некоторых воплощениях В-клетки памяти идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры CD19 (+) CD20 (+) CD27 (+) IgD (-) CD38 (-) BCMA (+/-). В особенно предпочтительных воплощениях В-клетки памяти идентифицируют как клетки, демонстрирующие маркеры CD19(+) CD20(+) CD27(+), возможно причем клетки также демонстрируют один или более чем один из маркеров, выбранных из BCMA(+) и/или CD38(-).

Авторы настоящего изобретения идентифицировали то, что мультиспецифичные (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть использованы в лечении или терапии пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, причем образец крови пациента демонстрирует количество растворимого BCMA менее чем количество растворимого BCMA у пациентов, страдающих от множественной миеломы (ММ), и/или количество растворимого BCMA, сравнимое с количеством растворимого BCMA у нормальных здоровых пациентов. Растворимый BCMA в образце крови (например, в выделенной сыворотке крови или плазме крови) пациента может быть измерен при помощи ELISA (иммуноферментный анализ),

например, с использованием иммуноанализа на микроносителях от Ampersand Biosciences (Lake Clear, NY).

В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует количество растворимого ВСМА менее чем количество растворимого ВСМА у пациентов, страдающих от злокачественного новообразования В-клеток (например, рака с экспрессией ВСМА). В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует количество растворимого ВСМА менее чем количество растворимого ВСМА у пациентов ММ, предпочтительно, приблизительно в 1,5 раза менее, приблизительно в 2 раза менее, приблизительно в 2,5 раза менее, приблизительно в 3 раза менее, приблизительно в 3,5 раза менее, приблизительно в 4 раза менее, приблизительно в 4,5 раза менее, приблизительно в 5 раз менее, приблизительно в 5,5 раз менее, или, приблизительно в 6 раз менее, чем количество растворимого ВСМА у пациентов ММ. В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует растворимый ВСМА менее чем приблизительно 150 нг/мл, менее чем приблизительно 100 нг/мл, менее чем приблизительно 75 нг/мл, менее чем приблизительно 50 нг/мл, менее чем приблизительно 40 нг/мл, менее чем приблизительно 35 нг/мл или менее чем приблизительно 30 нг/мл в соответствии с измерением при помощи ELISA. В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует количество растворимого ВСМА в пределах приблизительно 40 нг/мл, в пределах приблизительно 30 нг/мл, в пределах приблизительно 20 нг/мл, в пределах приблизительно 15 нг/мл, в пределах приблизительно 10 нг/мл, или в пределах приблизительно 5 нг/мл относительно количества растворимого ВСМА у нормального здорового индивида в соответствии с измерением при помощи ELISA. В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует количество растворимого ВСМА по меньшей мере 5 нг/мл, по меньшей мере 7,5 нг/мл, по меньшей мере 10 нг/мл, по меньшей мере 12,5 нг/мл, или по меньшей мере 15 нг/мл в соответствии с измерением при помощи ELISA. В некоторых воплощениях образец крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, демонстрирует количество растворимого ВСМА в интервале от приблизительно 5 нг/мл до 50 нг/мл, в интервале от приблизительно 5 нг/мл до 40 нг/мл, в интервале от

приблизительно 5 нг/мл до 30 нг/мл, в интервале от приблизительно 10 нг/мл до 50 нг/мл, в интервале от приблизительно 10 нг/мл до 40 нг/мл, или в интервале от приблизительно 10 нг/мл до 30 нг/мл, в соответствии с измерением при помощи ELISA. Растворимый ВСМА в образце крови (например, выделенной сыворотке крови или плазмы крови) пациента в соответствии с измерением при помощи ELISA может быть измерен с использованием иммуноанализа на микроносителях от Ampersand Biosciences (Lake Clear, NY). Авторы настоящего изобретения идентифицировали то, что мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть использованы в лечении или терапии пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства, вызванного плазмабластами и/или плазматическими клетками, при котором пациент демонстрирует плотность поверхностного рецептора ВСМА на плазмабластах, сравнимую с плотностью поверхностного рецептора ВСМА на плазмабластах у нормального взрослого добровольца.

В некоторых воплощениях пациент, нуждающийся в лечении или терапии аутоиммунного расстройства, демонстрирует плотность поверхностного рецептора ВСМА на плазмабластах менее чем приблизительно 10000 молекул, менее чем приблизительно 5000 молекул, менее чем приблизительно 2500 молекул, или менее чем приблизительно 2000 молекул, измеренную с использованием системы проточной цитометрии, основанной на стандартной кривой, построенной для микроносителей, покрытых антителами против ВСМА.

В некоторых воплощениях пациент, нуждающийся в лечении или терапии аутоиммунного расстройства, демонстрирует плотность поверхностного рецептора ВСМА на плазмабластах по меньшей мере приблизительно 500 молекул, по меньшей мере приблизительно 700 молекул, по меньшей мере приблизительно 900 молекул или по меньшей мере приблизительно 1000 молекул, измеренную с использованием системы проточной цитометрии, основанной на стандартной кривой, построенной для микроносителей, покрытых антителом против ВСМА.

В некоторых воплощениях пациент, нуждающийся в лечении или терапии аутоиммунного расстройства, демонстрирует плотность поверхностного рецептора ВСМА на плазмабластах в интервале от приблизительно 800 до приблизительно 2200 молекул, в интервале от приблизительно 900 до 2100 молекул, или в интервале от приблизительно 1000 до 2000 молекул с использованием системы проточной

цитометрии, основанной на стандартной кривой, построенной для микроносителей, покрытых антителом против ВСМА.

В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазмабластов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или 100% по сравнению с отсутствием лечения или контрольным лечением. В предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазмабластов у пациента по меньшей мере на 75%. В особенно предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазмабластов у пациента по меньшей мере на 90%.

В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазматических клеток у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или 100% по сравнению с отсутствием лечения или контрольным лечением. В предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазматических клеток у пациента по меньшей мере на 75%. В особенно предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазматических клеток у пациента по меньшей мере на 90%.

В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазматических клеток и плазмабластов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или 100% по сравнению с отсутствием лечения или контрольным лечением. В предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшению уровня плазматических клеток и плазмабластов у пациента по меньшей мере на 75%. В особенно предпочтительных воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к

уменьшению уровня плазматических клеток и плазмбластов у пациента по меньшей мере на 90%.

Существующие способы лечения аутоиммунных расстройств, таких как AAV, SLE или RA, включают циклофосфамид и/или моноклональное антитело против CD20 (например, ритуксимаб) с высокими дозами стероидов (например, глюкокортикоидов). Использованный здесь термин «контрольное лечение» (например, в отношении AAV) предпочтительно относится к лечению циклофосфамидом, ритуксимабом и/или стероидами. Альтернативно или дополнительно «контрольное лечение» (например, SLE или RA) относится к лечению агентами против TNF (например, инфликсимабом, адалимумабом, голимумабом, этанерцептом), антителами против IL6R (например, тоцилизумабом, сарилумабом), костимулирующими блокаторами (например, абатацептом), ингибиторами JAK (например, тофацитинибом, барицитинибом) и/или белимумабом. Дополнительные способы лечения включают циклофосфамид, метотрексат, азатиоприн, микофенолат, микофенолат мофетил и/или авакопан. Тем не менее, такие существующие способы лечения не всегда являются эффективными и/или долгосрочными. Кроме того, они могут демонстрировать побочные действия.

Не желая быть связанными теорией, настоящее изобретение предполагается для избирательного истощения клеток В-линии, вызывающих аутоиммунное расстройство, например, аутореактивных клеток В-линии, например, плазмбластов, плазматических клеток и В-клеток памяти. Таким образом, способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением может приводить в результате к более быстрой индукции ремиссии и/или предполагаются меньшие побочные действия по сравнению с контрольным лечением, которое не приводит к избирательному истощению клеток В-линии, вызывающих аутоиммунное расстройство.

В некоторых воплощениях способ лечения используют для индукции ремиссии. В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к более быстрой индукции ремиссии у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере, на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

Способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением может приводить в результате к более хорошему поддержанию ремиссии по сравнению с

контрольным лечением. Например, после истощения плазмбластов и плазматических клеток мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут подавлять и/или задерживать возникновение плазмбластов и плазматических клеток (например, в соответствии с измерением при помощи FACS и/или секреции IgG) из отрицательных по ВСМА предшественников даже после инкубации с факторами роста для их регенерации. Дополнительно, после истощения плазмбластов и плазматических клеток мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут подавлять и/или задерживать продукцию антител, например, аутоантител, вызывающих аутоиммунные расстройства даже после стимулирования CpG.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением подавлять и/или задерживать продукцию антител IgG несмотря на стимуляцию IL-2, BAFF и IL-21 или CpG (ODN2006) для индукции дифференцирования плазмбластов/клеток плазмы крови. Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут инкубироваться с выделенными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) в концентрации EC50 (средней эффективной концентрации) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов перед стимулированием CpG (ODN2006 10 мкг/мл), IL-2 (20 Е/мл), BAFF (200 нг/мл) и IL-21 (100 нг/мл) в течение 7 суток, после чего концентрации IgG может быть меньше чем, приблизительно, 4000 пг/мл, меньше чем, приблизительно, 3500 пг/мл, меньше чем, приблизительно, 3000 пг/мл, меньше чем, приблизительно, 2500 пг/мл, или меньше чем, приблизительно, 2000 пг/мл в соответствии с измерением при помощи ELISA. Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением альтернативно могут быть инкубированы с выделенными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) в концентрации EC90 (90% эффективная концентрация) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов перед стимулированием CpG (ODN2006 10 мкг/мл), IL-2 (20 Е/мл), BAFF (200 нг/мл) и IL-21 (100 нг/мл) в течение 7 суток, после чего концентрации IgG могут быть меньше чем, приблизительно, 2000 пг/мл, меньше чем, приблизительно, 1800 пг/мл, меньше чем, приблизительно, 1000 пг/мл, или меньше чем, приблизительно, 500 пг/мл в соответствии с измерением при помощи ELISA.

В некоторых воплощениях способ лечения используют для того, чтобы вызвать и поддерживать ремиссию. В некоторых воплощениях способ используют для поддержания ремиссии. В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к более длительному поддержанию ремиссии у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

В некоторых воплощениях аутоиммунное расстройство является рецидивирующим или устойчивым к лечению. Предполагается, что использованный здесь термин «рецидивирующий» означает возвращение расстройства или признаки и симптомы расстройства после периода улучшения. Предполагается, что использованный здесь термин «устойчивый к лечению» означает то, что конкретное расстройство устойчиво к или не восприимчиво к терапии конкретным терапевтическим агентом. Расстройство может быть устойчиво к лечению конкретным терапевтическим агентом с начала лечения конкретным терапевтическим агентом (т.е., не восприимчиво к исходному воздействию терапевтического агента) или в результате развития устойчивости к терапевтическому агенту в течение курса первого периода лечения терапевтическим агентом или во время последующего периода лечения терапевтическим агентом.

В некоторых воплощениях аутоиммунное расстройство представляет собой рецидивирующее расстройство или расстройство, устойчивое к лечению циклофосфамидом, моноклональными антителами против CD20 (например, ритуксимабом), глюкокортикоидами (например, метилпреднизолоном, дексаметазоном), антифолатами (например, метотрексатом), ингибиторами пуринового синтеза (например, азатиоприном, микофенолатом и/или микофенолата мофетилом), ингибиторами C5a (например, авакопаном), антителами против CD19, антагонистами BAFF/APRIL, ингибиторами протеасом (например, бортезомибом), моноклональными антителами CD22, агентами против TNF (например, инфликсимабом, адалимумабом, голимумабом, этанерцептом), антителами против IL6R (например, тоцилизумабом, сарилумабом), костимулирующими блокаторами (например, абатацептом), ингибиторами JAK (например, тофацитинибом, барицитинибом), белилумабом и/или ингибиторами тирозинкиназы Брутона (ВТК).

В альтернативных воплощениях аутоиммунное расстройство является впервые диагностированным.

Аутоиммунные расстройства, подлежащие лечению при помощи мультиспецифических (например, биспецифических) антител в соответствии с изобретением, включают без ограничения ахалазию, болезнь Аддисона, острую воспалительную димиелинизирующую полинейропатию – AIDP, болезнь Стилла у взрослых, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, нефрит с антителами против GBM/антителами против TBM, ревматоидный артрит, активируемый антителами против PAD4, антифосфолипидный синдром, астму, атопический дерматит, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную вегето-сосудистую дистонию, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную крапивницу, аксональную и нейрональную нейропатию (АМАН), болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественную пузырчатку слизистой оболочки, буллезную пузырчатку, болезнь Кастлемана (CD), целиакия, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную димиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хронический рецидивирующий множественный остеомиелит (CRMO), синдром Хурга-Штрауса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцовой пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодовой агглютинации, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, синдром Тибьержа-Вейссенбаха, болезнь Крона, дерматит, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (миелит зрительного нерва), сахарный диабет, дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный фасциит, узловатую эритему, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эванса, фибромиалгию, фиброзный альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, диффузный токсический зоб, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, тиреоидит Хашимото, аутоиммунную гемолитическую анемию, болезнь Шенлейн-Геноха (HSP), гестационный герпес или пемфигоид беременных (PG), гнойный гидраденит (HS) (инверсные угри), гипогаммаглобулинемию, идиопатическую мембранозную нефропатию,

идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, IgA-нефропатию, заболевание, связанное с IgG4, склерозирующее заболевание, связанное с IgG4, IgG нейропатию, IgM полинейропатию, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), миозит с тельцами включения (IBM), воспалительное заболевание кишечника (IBD), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный диабет (сахарный диабет 1 типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Kawasaki, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склерозирующий лишай, деревянистый конъюнктивит, IgA-зависимый линейный дерматоз (LAD), волчанку, хроническую болезнь Лайма, мембранозную нефропатию, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, болезнь Мухи-Габерманна, многофокальную моторную нейропатию (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастению гравис, миозит, нарколепсию, неонатальную волчанку, миелит зрительного нерва, нейтропению, зрительный рубцовый пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS (аутоиммунное нервно-психиатрическое расстройство у детей), паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри Ромберга, парспланит (периферический увеит), невралгическую амиотрофию, пузырчатку, обыкновенную пузырчатку, листовидную пузырчатку, периферическую нейропатию, перивенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию (РА), синдром POEMS (сочетание полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, наличия М-протеина и поражений кожи), узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы I, II и III типа, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, посткардиотомный синдром, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориатический артрит, истинную эритроцитарную аплазию (PRCA), гангренозную пиодермию, синдром Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, рецидивирующий полихондрит, синдром усталых ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию, сенсibilизированные/предварительно сформированные антитела при пересадке твердых органов, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром ригидного человека (SPS), системную красную волчанку (SLE), подострый

бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию (SO), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, сахарный диабет 1 типа, неспецифический язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго, синдром Фогта-Коянаги-Харада; и гранулематоз Вегенера. В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство не представляет собой заболевание, связанное с IgG4. В предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство представляет собой AAV (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению AAV), SLE (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению SLE), или ревматоидный артрит (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению ревматоидный артрит). В особенно предпочтительных воплощениях аутоиммунное расстройство представляет собой AAV (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению AAV) или ревматоидный артрит (например, рецидивирующий или устойчивый к лечению ревматоидный артрит).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением используют для лечения или терапии AAV. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением используют для лечения или терапии ревматоидного артрита. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением используют для лечения или терапии SLE. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением используют для лечения или терапии AAV и ревматоидного артрита. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением используют для лечения или терапии AAV, SLE и ревматоидного артрита.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии AAV, где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или терапии мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, при котором мультиспецифическое антитело связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело, которое связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3), для применения в лечении или терапии ААV у субъекта (например, человека).

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии ревматоидного артрита (например, рецидивирующего или устойчивого к лечению ревматоидного артрита), где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или терапии, мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, причем мультиспецифическое антитело связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело, которое связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3), для применения в лечении или терапии ревматоидного артрита (например, рецидивирующего или устойчивого к лечению ревматоидного артрита) у субъекта (например, человека).

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии SLE (например, рецидивирующего или устойчивого к лечению SLE), где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или терапии, мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, причем мультиспецифическое антитело связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело, которое связывается с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3), для применения в лечении или терапии SLE (например, рецидивирующего или устойчивого к лечению SLE) у субъекта (например, человека).

Опосредованный Т-клетками лизис, Т-клеточная активация и продукция цитокинов

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением связываются с антигеном, который способствует активации одной или

более чем одной Т-клетки (например, CD3). Использованный здесь термин «Т-клеточный антиген» относится к антигену, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3).

В предпочтительных воплощениях Т-клеточный антиген (например, CD3) представляет собой человеческий Т-клеточный антиген (например, человеческий CD3). В предпочтительных воплощениях Т-клеточный антиген представляет собой CD3.

Таким образом, связывание мультиспецифических (например, биспецифических) антител в соответствии с изобретением с Т-клеточным антигеном (например, CD3) может обеспечить рекрутинг Т-клеток экспрессирующими ВСМА клетками для того, чтобы привести в результате к лизису экспрессирующих ВСМА клеток (например, плазмбласта, клетки плазмы крови и/или В-клетки памяти). Таким образом, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением способны вызвать избирательное истощение клеток, экспрессирующих ВСМА (например, плазмбласта, клетки плазмы крови и/или В-клетки памяти) путем перенаправления цитотоксических Т-клеток к клеткам, экспрессирующим ВСМА.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали то, что мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть введены в более низкой дозе при лечении расстройств, отличающихся низким отношением экспрессирующих ВСМА клеток-мишеней с эффекторными Т-клетками (отношение Т:Е), например, аутоиммунных расстройств, что может потребоваться для лечения заболеваний, отличающихся высоким отношением Т:Е, например, злокачественных новообразований В-клеток, таких как множественная миелома.

Соответственно, в некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вводят субъекту, страдающему от аутоиммунного расстройства, причем индивид демонстрирует отношение клеток, экспрессирующих ВСМА, к эффекторным Т-клеткам менее чем приблизительно 1:15, менее чем приблизительно 1:30, менее чем приблизительно 1:50, менее чем приблизительно 1:100 или менее чем 1:500. Отношение клеток, экспрессирующих ВСМА, к эффекторным Т-клеткам (отношение Т:Е) может быть измерено в выделенном образце жидкости организма субъекта, страдающего от

аутоиммунного расстройства, например, в образце крови, аспирате костного мозга или синовиальной жидкости субъекта, страдающего от аутоиммунного расстройства.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали то, что мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут достигать терапевтического эффекта в меньшей дозе при лечении раскрытых здесь аутоиммунных расстройств (например, аутоиммунных расстройств, вызванных В-клетками, экспрессирующими ВСМА), что может потребовалось бы для лечения В-клеточных злокачественных новообразований (например, рака, при котором происходит экспрессия ВСМА, такого как множественная миелома). В частности, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут обеспечивать лизис патогенных клеток (например, экспрессирующих ВСМА аутореактивных В-клеток) при аутоиммунном расстройстве в меньшей дозе (например, от 10 раз меньшей до 100 раз меньшей), чем доза, требующаяся для лизиса патогенных клеток (например, экспрессирующих ВСМА злокачественных клеток) множественной миеломы.

Таким образом, в одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии аутоиммунного расстройства при помощи мультиспецифических (например, биспецифических) антител, которые связываются с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3) и ВСМА, причем лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в дозе от приблизительно 0,01 мг до, приблизительно, 1 мг. В воплощениях, в которых мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело представляет собой раскрытое здесь антитело СС-93269, доза может составлять от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1 мг.

В некоторых воплощениях любого из раскрытых здесь аспектов лечение включает по меньшей мере одну дозу мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, например, по меньшей мере две или по меньшей мере три дозы мультиспецифического (например, биспецифического) антитела. В альтернативных воплощениях вводят до трех доз мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, например, до двух доз или одну дозу мультиспецифического (например, биспецифического) антитела. В предпочтительных

воплощениях вводят одну дозу мультиспецифического (например, биспецифического) антитела.

В особенно предпочтительных воплощениях лечение включает одну дозу мультиспецифического (например, биспецифического) антитела от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1 мг.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вызывают лизис плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов, причем мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением представлены в концентрации меньше чем та, которая необходима для уничтожения экспрессирующих ВСМА раковых клеток (например, клеток линии JEKO-1 или клеток линии MM). РВМС могут быть выделены из образцов цельной крови, например, с использованием градиента фиколла, ресуспендированных в RPMI + 10% HI FBS (фетальная бычья сыворотка). В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вызывают лизис плазмабластов при инкубации с цельной кровью (например, образцом цельной крови у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов, причем мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением представлены в концентрации меньше чем та, которая необходима для уничтожения экспрессирующих ВСМА раковых клеток (например, клеток линии JEKO-1 или клеток линии MM). Истощение плазмабластов измеряют при помощи FACS (сортировка клеток с активацией флуоресценции), при помощи которой плазмабласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+). В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов при 50% эффективной концентрации (EC_{50}) менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,6 нМ, менее чем приблизительно 0,4 нМ, менее чем приблизительно 0,3 нМ или менее чем приблизительно 0,25 нМ, менее чем приблизительно 0,2 нМ, менее чем приблизительно 0,1 нМ, менее чем приблизительно 0,05 нМ, менее чем приблизительно 0,02 нМ, менее чем приблизительно

0,01 нМ или менее чем приблизительно 0,005 нМ. В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вызывают лизис 50% плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов в концентрации приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 0,8 нМ или менее, приблизительно 0,6 нМ или менее, приблизительно 0,4 нМ или менее, приблизительно 0,3 нМ или менее, приблизительно 0,25 нМ или менее, приблизительно 0,02 нМ или менее, приблизительно 0,01 нМ или менее, приблизительно 0,007 нМ или менее, или приблизительно 0,005 нМ или менее. Истощение плазмабластов измеряют при помощи FACS, при помощи которой плазмабласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+). В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,6 нМ, менее чем приблизительно 0,4 нМ, менее чем приблизительно 0,3 нМ, менее чем приблизительно 0,2 нМ, менее чем приблизительно 0,1 нМ, менее чем приблизительно 0,08 нМ, или менее чем приблизительно 0,06 нМ. В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вызывают лизис 90% плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов в концентрации менее чем приблизительно 1 нМ, меньше чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,6 нМ, менее чем приблизительно 0,4 нМ, менее чем приблизительно 0,3 нМ, менее чем приблизительно 0,2 нМ, менее чем приблизительно 0,1 нМ, менее чем приблизительно 0,08 нМ, или менее чем приблизительно 0,06 нМ. Истощение плазмабластов измеряют при помощи FACS, при помощи которой плазмабласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов при 99% эффективной

концентрации (EC₉₉) менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,9 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,7 нМ, или менее чем приблизительно 0,6 нМ. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением вызывают лизис 99% плазмбластов при инкубации с выделенными РВМС (например, РВМС, выделенными у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов в концентрации менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,9 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,7 нМ, или менее чем приблизительно 0,6 нМ. Истощение плазмбластов измеряют при помощи FACS, при помощи которой плазмбласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+).

Синдром высвобождения цитокинов (CRS) представляет собой один из наиболее тяжелых побочных действий привлекающих Т-клетки способов иммунотерапии для лечения рака, такого как множественная миелома (Shimabukuro-Vornhagen, A. *et. al* (2018) Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*, 6(1) 56). Не желая быть связанными теорией, CRS может возникать в результате большой и/или быстрой секреции цитокинов, например, из-за активации и/или пролиферации иммунных эффекторных клеток. Повышенные уровни цитокинов, таких как IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10 и/или гранзим В, обнаружены после лечения множественной миеломы привлекающих Т-клетки способов иммунотерапии.

Поскольку аутоиммунные расстройства ассоциируются с высокими уровнями цитокинов даже перед лечением (смотри Kunz, M. and Ibrahim, S. (2009) Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. *Mediators of Inflammation*, Article ID 979258; and Andreakos *et. al* (2002), Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Issues 4–5, Pages 299-313), привлекающие Т-клетки способы иммунотерапии могут рассматриваться как не привлекательная терапия аутоиммунных расстройств. Тем не менее, авторы настоящего изобретения неожиданно идентифицировали то, что мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть введены в терапевтически эффективной дозе против аутоиммунных расстройств в соответствии с изобретением при отсутствии значительной Т-клеточной активации или с минимальной Т-клеточной активацией и без значительной продукции цитокинов или с минимальной продукцией цитокинов. Соответственно,

мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут лечить или осуществлять терапию аутоиммунных расстройств в соответствии с изобретением при минимальном риске неблагоприятных явлений, ассоциирующихся с Т-клеточной активацией, и/или продукцией цитокинов, например, CRS.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии аутоиммунного расстройства при помощи мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, которое связывается с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3) и ВСМА, причем лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в терапевтически эффективной дозе при отсутствии значительной Т-клеточной активации или минимальной Т-клеточной активацией.

Используемый здесь термин «отсутствие значительной Т-клеточной активации или минимальная Т-клеточная активация» относится к тому, что менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% Т-клеток активированы выше базового уровня выделенных РВМС или цельной крови (например, выделенных РВМС или цельной крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в соответствии с измерением при помощи поверхностной экспрессии маркера активации CD69. Предпочтительно, термин «отсутствие значительной Т-клеточной активации или минимальная Т-клеточная активация» относится к тому, что менее чем 20% Т-клеток активированы выше базового уровня выделенных РВМС или цельной крови (например, выделенных РВМС или цельной крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства), в соответствии с измерением поверхностной экспрессии маркера активации CD69. Предпочтительно, о Т-клеточной активации сообщается для CD3+ Т-клеток (например, CD3+ CD4+ Т-клеток или CD3+ CD8+ Т-клеток, или обеих).

Используемый здесь термин «базовый уровень» активированных Т-клеток (например, «базовый уровень» CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69) определяется как процентная доля соответствующих Т-клеток (например, CD8(+) Т-клеток), экспрессирующих соответствующий маркер активации (например, CD69) в контрольном образце выделенных РВМС или цельной крови (например, выделенных РВМС или цельной крови у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства). Предпочтительно, контрольный образец обрабатывают контрольным антителом против

CD3, например, контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3. Предпочтительно, о Т-клеточной активации сообщается для CD3+ Т-клеток (например, CD3+ CD4+ Т-клеток или CD3+ CD8+ Т-клеток, или обеих). В некоторых воплощениях существует отсутствие значительной Т-клеточной активации или минимальная Т-клеточная активация, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. Т-клеточная активация может быть измерена путем окрашивания линии Т-клеток (CD3, CD4 и CD8) и активации маркеров (CD69, CD25 и CD154). Предпочтительно, о Т-клеточной активации сообщалось для CD3+ Т-клеток (CD3+ CD4+ Т-клеток или CD3+ CD8+ Т-клеток, или обеих).

В предпочтительных воплощениях отсутствует значительное увеличение уровня CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, или существует минимальное увеличение уровня CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В предпочтительных воплощениях существует менее 10%, менее 5%, менее 4%, менее чем приблизительно 3%, менее 2% или менее 1% CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В некоторых воплощениях отсутствует увеличение частоты CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов.

В некоторых воплощениях существует менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем 2% или менее чем 1% CD4(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, и CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В некоторых воплощениях отсутствует увеличение уровня CD4(+)Т-клеток, экспрессирующих CD69, и CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов.

В некоторых воплощениях отсутствует значительная Т-клеточная активация или минимальная Т-клеточная активация, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. Т-клеточная активация может быть измерена путем окрашивания клеток Т-клеток (CD3, CD4 и CD8) и активации маркеров (CD69, CD25 и CD154). Предпочтительно, о Т-клеточной активации сообщалось для CD3+ Т-клеток (CD3+ CD4+ Т-клеток или CD3+ CD8+ Т-клеток, или обеих). В предпочтительных воплощениях отсутствует значительное увеличение уровня CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, или существует минимальное увеличение уровня CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В предпочтительных воплощениях существует менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем приблизительно 3%,

менее чем 2% или менее чем 1% CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) для лизиса плазмабластов в течение 24 часов.

В некоторых воплощениях существует менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем 2% или менее чем 1% CD4(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, и CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) для лизиса плазмабластов в течение 24 часов. В некоторых воплощениях отсутствует увеличение уровня CD4(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, и CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства), при 90% эффективной концентрации (EC_{90}) для лизиса плазмабластов в течение 24 часов.

В некоторых воплощениях существует менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10% или менее чем 5% CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69 выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или РВМС цельной крови у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при 99% эффективной концентрации (EC_{99}) для лизиса плазмабластов в течение 24 часов. Предпочтительно, о Т-клеточной активации сообщалось для CD3+ Т-клеток (CD3+ CD4+ Т-клеток или CD3+ CD8+ Т-клеток, или обеих).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис более чем 40%, более чем

45%, более чем 50%, более чем 55%, более чем 60%, более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 95% или приблизительно 100% плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов, в концентрации, при которой количество CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, увеличивается на менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1% выше базового уровня.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис приблизительно 50%, приблизительно 90% или приблизительно 99% плазмабластов при инкубации с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов, в концентрации, при которой количество CD8(+) Т-клеток, экспрессирующих CD69, составляет менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1% выше базового уровня. В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или управления течением аутоиммунного расстройства при помощи мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, которое связывается с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3) и ВСМА, причем лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в терапевтически эффективной дозе при отсутствии значительной продукции цитокинов или минимальной продукции цитокинов.

Используемый здесь термин «отсутствие значительной продукции цитокинов или минимальная продукция цитокинов» относится к уровням цитокинов менее чем 20 пг/мл, менее чем 10 пг/мл или менее чем 5 пг/мл выше базового уровня выделенных РВМС или цельной крови (например, выделенных РВМС или цельной крови у пациента,

страдающего от аутоиммунного расстройства). Предпочтительно термин «отсутствие значительной продукции цитокинов или минимальная продукция цитокинов» относится к уровням цитокинов менее чем 5 пг/мл выше базового уровня цитокинов в образце донора. Уровни цитокинов могут быть измерены с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I.

Используемый здесь термин «базовый» уровень цитокинов (например, «базовый уровень $IFN\gamma$ ») определяют как уровень соответствующего цитокина (например, $IFN\gamma$) в контрольном образце выделенных РВМС или цельной крови (например, выделенных РВМС или цельной крови пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства). Предпочтительно, контрольный образец обрабатывают контрольным антителом против CD3, например, контрольным антителом 2+1 против HEL против CD3. Уровни цитокинов могут быть измерены с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I.

В некоторых воплощениях отсутствует значительная продукция цитокинов или минимальная продукция цитокинов, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. Продукцию цитокинов: $IFN\gamma$, IL-6, IL-2, IL-10, IL-1 β , гранзима В и/или перфорина измеряют с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I. В некоторых воплощениях уровень провоспалительных цитокинов (например, $IFN\gamma$, IL-6, IL-2, IL-10, IL-1 β , гранзима В и/или перфорина) составляет менее 50 пг/мл, менее 20 пг/мл, менее 10 пг/мл или менее 5 пг/мл выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью у пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов.

В предпочтительных воплощениях отсутствует значительное увеличение $IFN\gamma$ или минимальное увеличение $IFN\gamma$, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть инкубированы с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней

эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В некоторых воплощениях уровень $IFN\gamma$ составляет менее 50 пг/мл, менее 20 пг/мл, менее 10 пг/мл или менее 5 пг/мл выше базового уровня, когда мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением инкубируют с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут вызывать лизис более 40%, более 45%, более 50%, более 55%, более 60%, более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 95% или приблизительно 100% плазмбластов при инкубации с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) в течение 24 часов, в концентрации, при которой $IFN\gamma$ увеличивается на менее чем приблизительно 50 пг/мл, менее чем приблизительно 10 пг/мл или менее чем приблизительно 5 пг/мл выше базового уровня.

Терапию антителами против рецептора $IL-6$ используют для лечения CRS, учитывая центральную роль $IL-6$ в прогрессе CRS (Shimabukuro-Vornhagen, A. et. al (2018) Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*, 6(1) 56). В некоторых воплощениях уровень $IL-6$ составляет менее 10 пг/мл или менее чем 5 пг/мл выше базового уровня, когда мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением инкубирует с выделенными РВМС или цельной кровью (например, выделенными РВМС или цельной кровью пациента, страдающего от аутоиммунного расстройства) при средней эффективной концентрации (EC_{50}) для лизиса плазмбластов в течение 24 часов.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или терапии аутоиммунного расстройства при помощи мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, которое связывается с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, $CD3$) и $VCMA$, причем лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в терапевтически эффективной дозе при минимальном CRS.

Используемый здесь термин «минимальная CRS» относится к уменьшенной частоте синдрома высвобождения цитокинов (CRS) в соответствии с CTCAE v. 5.0 Grade 1 у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением. Предпочтительно, термин «минимальная CRS» относится к CTCAE v. 5.0 Grade 1 CRS. CTCAE v. 5.0 Grade 1 CRS определяется NIH, National Cancer Institute (Национальный институт онкологии), Division of Cancer Treatment and Diagnosis (Отдел лечения и диагностики рака) (DCTD), Cancer Therapy Evaluation Program (Программа оценки терапии рака) (CTEP).

В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшенной частоте синдрома высвобождения цитокинов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

В некоторых воплощениях способ лечения или терапии в соответствии с настоящим изобретением приводит в результате к уменьшенной частоте инфекции у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

Мультиспецифическое антитело

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением в частности связываются с ВСМА и с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3). Термины «антитело против ВСМА и антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3)» или «антитело, которое связывается с ВСМА и с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3)», относятся к мультиспецифическому (например, биспецифическому) антителу, которое способно связываться с ВСМА и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3), с достаточной аффинностью, таким образом, что антитело полезно в качестве терапевтического агента. Последнее достигается путем получения молекулы, которая включает первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ВСМА, второе антитело или

антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки (например, CD3). Такие мультиспецифические антитела могут представлять собой триспецифические антитела или биспецифические антитела. В предпочтительных воплощениях мультиспецифические антитела представляют собой биспецифические антитела.

Используемый здесь термин «BCMA» относится к человеческому В-клеточному антигену созревания, также известному как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), который представляет собой член суперсемейства рецептора некроза опухоли, который предпочтительно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках. Внеклеточный домен BCMA состоит в соответствии с UniProt из аминокислот 1-54 (или 5-51). Используемые здесь термины «антитело против BCMA», «анти-BCMA антитело» или «антитело, которое связывается с BCMA» относятся к антителу, специфически связывающемуся с внеклеточным доменом BCMA.

Термин «специфически связывающееся с BCMA» относится к антителу, которое способно связываться с определенной мишенью с достаточной аффинностью, таким образом, что антитело является полезным в качестве терапевтического агента против BCMA. В некоторых воплощениях антитело, специфически связывающееся с BCMA, не связывается с другими антигенами, или не связывается с другими антигенами с аффинностью, достаточной для того, чтобы привести к физиологическому действию.

В некоторых воплощениях степень связывания антитела против BCMA с не родственным белком, отличающимся от BCMA, приблизительно в 10 раз, предпочтительно более чем в 100 раз меньше чем связывание антитела с BCMA, измеренное, например, при помощи поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, Biacore[®], иммуноферментного анализа (ELISA) или проточной цитометрии (FACS). В одном из воплощений антитело, которое связывается с BCMA, обладает константой диссоциации (K_d) 10^{-8} М или менее, предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-13} М, предпочтительно от 10^{-9} М до 10^{-13} М.

В одном из воплощений антитело против BCMA связывается с эпитопом BCMA, который является консервативным среди BCMA различных видов, предпочтительно, среди человека и яванского макака, и дополнительно предпочтительно также среди BCMA мыши и крысы.

Предпочтительно, антитело против ВСМА специфически связывается с группой ВСМА, состоящей из человеческого ВСМА и ВСМА млекопитающих, отличающихся от человека, предпочтительно ВСМА яванского макака, мыши и/или крысы. Антитела против ВСМА анализируют при помощи ELISA в отношении связывания с человеческим ВСМА с использованием связанного с планшетом ВСМА. Для этого анализа используют количество связанного с планшетом ВСМА, составляющего, предпочтительно, 1,5 мкг/мл и концентрацию(и) антитела против ВСМА, находящуюся(и) в диапазоне от 0,1 пМ до 200 нМ.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением связываются с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, например, Т-клеточного антигена. В предпочтительных воплощениях, Т-клеточный антиген представляет собой человеческий Т-клеточный антиген. Антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, может быть выбран из группы, состоящей из CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR ζ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2 или CD226. В предпочтительных воплощениях антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, представляет собой CD3, например, человеческий CD3. Соответственно, в предпочтительных воплощениях, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением связываются с CD3, например, человеческим CD3.

Термин «CD3» относится к мультисубъединичному комплексу белка человеческого CD3. Мультисубъединичный комплекс белка человеческого CD3 состоит из 6 отдельных полипептидных цепей. Таким образом, этот термин включает цепь CD3 γ (SwissProt P09693), цепь CD3 δ (SwissProt P04234), две цепи CD3 ϵ (SwissProt P07766) и один гомодимер цепи CD3 ζ (SwissProt 20963), который ассоциируется с цепью α и β Т-клеточного рецептора. Термин охватывает «полноразмерные» не обработанные CD3, а также любой вариант CD3, изоформу и гомолог по видам, который в природе экспрессируется клетками (включающими Т-клетки) или может экспрессироваться на клетках, трансфицированных генами или кДНК, кодирующими эти полипептиды.

Термин «специфически связывающийся с CD3» относится к антителу, которое способно связываться с определенной мишенью с достаточной аффинностью таким образом, что антитело полезно в качестве терапевтического агента против CD3. В

некоторых воплощениях антитела, специфически связывающееся с CD3, не связывается с другими антигенами, или не связывается с другими антигенами с аффинностью, достаточной для того, чтобы привести к физиологическому действию.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть проанализированы при помощи SPR, например, *Viacore*[®], для связывания с CD3. В некоторых воплощениях биспецифические антитела связываются с человеческим CD3 с константной диссоциации (K_D) приблизительно 10^{-7} М или менее, K_D приблизительно 10^{-8} М или менее, K_D приблизительно 10^{-9} М или менее, K_D приблизительно 10^{-10} М или менее, K_D приблизительно 10^{-11} М или менее или K_D приблизительно 10^{-12} М или менее, определенной при помощи анализа путем поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно измеренной с использованием *Viacore 8K* при 25°C. В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела связываются с человеческим CD3 с константой диссоциации (K_D) приблизительно 10^{-8} М или менее.

Термин «антитело» здесь охватывает различные структуры антитела, включающие без ограничения моноклональное антитело, поликлональные антитела, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела и фрагменты антитела до тех пор, пока они демонстрируют желаемую антигенсвязывающую активность.

«Тяжелая цепь» включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную здесь как «VH») и константную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную здесь как «CH»). Константная область тяжелой цепи включает константные домены CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи (классы антитела IgA, IgD и IgG) и возможно константный домен CH4 тяжелой цепи (классы антитела IgE и IgM).

«Легкая цепь» включает переменный домен легкой цепи (сокращенно обозначенный здесь как «VL») и константный домен легкой цепи (сокращенно обозначенный здесь как «CL»). Переменные области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с промежуточными областями, которые являются более консервативными, названными каркасными областями (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Константные домены»

тяжелой цепи и легкой цепи не вовлечены в непосредственное связывание антитела с мишенью, а демонстрируют различные эффекторные функции.

Связывание между антителом и его антигеном-мишенью или эпитопом опосредовано областями, определяющими комплементарность (CDR). CDR представляют собой области с высокой вариабельностью последовательности, расположенные в вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела, где они образуют антигенсвязывающий сайт. CDR представляют собой основные детерминанты специфичности антигена. Как правило, каждая из тяжелой цепи и легкой цепи антитела включает три CDR, которые располагаются не последовательно. Области CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антител в соответствии с изобретением и, таким образом, обеспечивают еще один аспект в соответствии с изобретением.

Используемый здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает любую природную или искусственную конфигурацию антигенсвязывающего полипептида, включающего одну, две или три CDR легкой цепи, и/или одну, две или три CDR тяжелой цепи, причем полипептид способен связываться с антигеном. Таким образом, термин относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая включает фрагмент интактного антитела, который связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антитела (например, scFv); и мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, образованные из фрагментов антитела.

Термины «Fab-фрагмент» и «Fab» используются здесь взаимозаменяемо и содержат одну легкую цепь (т.е. константный домен CL и VL) и одну тяжелую цепь (т.е. константный домен CH1 и VH). Тяжелая цепь фрагмента Fab не способна образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

«Fab'-фрагмент» содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, но дополнительно к CH1 и VH, «Fab'-фрагмент» содержит область тяжелой цепи между доменами CH1 и CH2, которая требуется для образования межцепочечной дисульфидной связи. Таким образом, два «Fab'-фрагмента» могут ассоциироваться путем образования дисульфидной связи с образованием молекулы F(ab')₂.

«Фрагмент F(ab')₂» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая цепь включает фрагмент константной области, необходимый для образования межцепочечной дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

«Fv-фрагмент» содержит только переменные области тяжелой и легкой цепи. Он не содержит константные области.

«Однодоменное антитело» представляет собой фрагмент антитела, содержащий одну единицу домена антитела (например, VH или VL).

«Одноцепочечный Fv» («scFv») представляет собой фрагмент антитела, содержащий домены VH и VL антитела, связанные вместе с образованием единичной цепи. Полипептидный линкер обычно используют для связи доменов VH и VL в scFv.

«Тандемный scFv», также известный как TandAb[®], также представляет собой одноцепочечную молекулу Fv, образованную путем ковалентного связывания двух scFvs в тандемной ориентации с гибким пептидным линкером.

«Привлекающий T-клетки биспецифический активатор» (BiTE[®]) представляет собой слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных доменов (scFvs), на одной полипептидной цепи. Один из scFvs связывается с T-клетками при помощи рецептора CD3, а другой с антигеном опухолевой клетки.

«Диатело» представляет собой небольшой двухвалентный и биспецифический фрагмент антитела, включающий переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) на той же самой полипептидной цепи (VH-VL), связанные пептидным линкером, который является слишком коротким для того, чтобы обеспечивать спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи (Kirgjanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772). Последнее усиливает спаривание с комплементарными доменами другой цепи и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антигенсвязывающими сайтами.

«DARPin» представляет собой биспецифическую молекулу повтора анкирина. DARPins получают из природных анкириновых белков, которые могут быть обнаружены в человеческом геноме, и представляют собой один из наиболее распространенных типов связывающих белков. Молекулу библиотеки DARPin определяют при помощи природных повторяющихся последовательностей анкиринового белка с использованием 229 анкириновых повторов для исходной конструкции и других 2200 для последующей оптимизации. Эти модули служат в качестве строительных блоков для библиотек

DARPin. Модули библиотек напоминают последовательности человеческого генома. DARPin состоит из от 4 до 6 молекул. Поскольку каждый модуль составляет приблизительно 3,5 кДа, размер средней DARPin составляет 16-21 кДа. Выбор связывающих молекул осуществляют при помощи рибосомального дисплея, который является полностью бесклеточным и описан в He M. и Taussig MJ., *Biochem Soc Trans.* 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

Последовательность CDR может быть идентифицирована путем ссылки на любую систему нумерации, известную в области техники, например, систему Кабата (Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); систему Чотиа (Chothia &, Lesk, “Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,” *J. Mol. Biol.* 196, 901–917 (1987)); или систему IMGT (Lefranc et al., “IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55–77 (2003)).

Таблица 1: Определения CDR

	Кабата	Чотиа	IMGT
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-56	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	24-34	27-38
VL CDR2	50-56	50-56	56-65
VL CDR3	89-97	89-97	105-117

Для аминокислотных позиций константной области тяжелой цепи, обсуждаемых в изобретении, нумерация в соответствии с индексом EU впервые описана в Edelman, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85). Нумерация EU в соответствии с Edelman также изложена в Kabat *et al.* (1991) (*выше.*). Таким образом, термины «индекс EU, изложенный Кабатом», «индекс EU», «индекс EU Кабата» или «нумерация EU» в контексте тяжелой цепи относятся к системе нумерации остатков, основанной на человеческом антителе IgG1 EU в соответствии с Edelman *et al*, как изложено в Kabat *et*

al. (1991). Система нумерации, используемая для аминокислотной последовательности константной области легкой цепи аналогично изложена в Kabat *et al.* (выше). Таким образом, используемый здесь термин «нумерация в соответствии с Кабатом» относится к системе Кабата, изложенной в Kabat *et al.* (выше).

Антитела в соответствии с изобретением и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены у любых видов при помощи рекомбинантных способов. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть мышинными, крысиными, козьими, лошадиными, свиными, бычьими, куриными, кроличьими, верблюжьими, ослиными, человеческими или их химерными вариантами. Для применения для введения людям антитела, отличающиеся от человеческих, или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть генетически или структурно изменены таким образом, чтобы быть менее антигенными при введении пациенту-человеку.

Особенно предпочтительны человеческие или гуманизированные антитела, особенно в виде рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркасные области или «области определения комплементарности» (CDR) модифицированы таким образом, что включают CDR иммуноглобулина с отличающейся специфичностью относительно родительского иммуноглобулина. Например, мышинные CDR могут быть привиты на каркасную область человеческого антитела для получения «гуманизированного антитела». Смотри, например, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; и Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. В некоторых воплощениях «гуманизированные антитела» представляют собой антитела, в которых константная область дополнительно модифицирована или изменена относительно исходного антитела для формирования свойств антител в соответствии с изобретением, особенно в связи со связыванием C1q и/или связыванием рецептора Fc (FcR).

Термин «человеческое антитело» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности антител, продуцируемых человеком или человеческой клеткой, или полученных из источника, отличающегося от человека, в котором используются репертуары человеческого антитела или другие последовательности, кодирующие антитело человека. Данное определение человеческого антитела специфическим образом исключает гуманизированное антитело, включающее антигенсвязывающие

остатки, отличающиеся от человеческих. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных в области техники, включающих библиотеки фагового дисплея.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, включающему переменную область, т.е. связывающую область из одного источника или видов, и, по меньшей мере, фрагмент константной области, полученный из отличающегося источника или видов, обычно получаемому при помощи способов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, включающие переменную область мышиного антитела и константную область человеческого антитела. Другие предпочтительные формы «химерных антител», охваченные в настоящем изобретении, представляют собой антитела, в которых константная область модифицирована или изменена относительно исходного антитела для формирования свойств антитела в соответствии с изобретением, особенно в связи со связыванием Clq и/или связыванием рецептора Fc (FcR). Такие химерные антитела также названы «антителами с переключением класса». Химерные антитела представляют собой продукт экспрессии генов иммуноглобулина, включающих сегменты ДНК, кодирующие переменные области иммуноглобулина и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулина. Способы получения химерных антител, включающие обычную рекомбинантную ДНК и способы трансфекции генов, хорошо известны в области техники. См. например, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США №№ 5202238 и 5204244.

Термины «область Fc » и « Fc » используются здесь взаимозаменяемо и относятся к фрагменту нативного иммуноглобулина, который образуется двумя цепями Fc . Каждая «цепь Fc » включает константный домен $CH2$ и константный домен $CH3$. Каждая цепь Fc также может включать шарнирную область. Нативная область Fc является гомодимерной. В некоторых воплощениях область Fc может содержать модификации для усиления гетеродимеризации Fc .

Термин «часть Fc » относится к фрагменту антитела в соответствии с изобретением или его антигенсвязывающему фрагменту, который соответствует области Fc .

Существуют пять основных классов константной области тяжелой цепи, классифицируемых как IgA , IgG , IgD , IgE и IgM , каждый с характерными эффекторными

функциями, обозначенными как изотип. Например, IgG разделяется на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекула Ig взаимодействует с множеством классов клеточных рецепторов. Например, молекула IgG взаимодействует с тремя классами рецепторов Fc γ (Fc γ R), специфическими в отношении класса IgG антител, а именно, Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Сообщалось о том, что важные последовательности для связывания IgG с рецепторами Fc γ R расположены в доменах CH2 и CH3.

Антитела в соответствии с изобретением или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь любой изотип, т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические изомеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулина (Ig). В предпочтительных воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют изотип IgG. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой любой подкласс IgG, например, изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В предпочтительных воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют изотип IgG1.

В некоторых воплощениях антитела включают константную область тяжелой цепи, которая имеет изотип IgG. В некоторых воплощениях антитела включают часть константной области тяжелой цепи, которая имеет изотип IgG. В некоторых воплощениях константная область IgG или ее часть представляет собой константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, константная область IgG или ее часть представляет собой константную область IgG1.

Антитела в соответствии с изобретением или их антигенсвязывающие фрагменты могут включать легкую цепь лямбда или легкую цепь каппа.

В предпочтительных воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают легкую цепь, которая представляет собой легкую цепь каппа. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает легкую цепь, включающую константную область легкой цепи (CL), которая представляет собой константную область каппа.

В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую переменную область легкой цепи (VL), которая представляет собой переменную область каппа. Предпочтительно, легкая цепь каппа включает VL, которая представляет собой VL каппа, и CL, которая представляет собой CL каппа.

Альтернативно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут включать легкую цепь, которая представляет собой легкую цепь лямбда. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает легкую цепь, включающую константную область легкой цепи (CL), которая представляет собой константную область лямбда. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую переменную область легкой цепи (VL), которая представляет собой переменную область лямбда.

Сконструированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, в которых модификации осуществлены с остатками каркаса в пределах VH и/или VL. Такие модификации могут улучшать свойства антитела, например, уменьшать иммуногенность антитела и/или улучшать продукцию и очистку антитела.

Раскрытые здесь антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть дополнительно модифицированы с использованием обычных способов, известных в области техники, например, с использованием аминокислотной(ых) делеции(й), вставки(ок), замены(замен), добавления(й) и/или рекомбинации(й) и/или любой(ых) другой(их) модификации(й), известной(ых) в области техники, сами по себе или в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащие в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту в данной области техники.

Антитела в соответствии с изобретением и их антигенсвязывающие фрагменты также включают производные, которые являются модифицированными (например, путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу) таким образом, что ковалентное присоединение не предотвращает связывание антитела со своим эпитопом или иное нарушение биологической активности антитела. Примеры подходящих производных включают без ограничения фукозилированные антитела, нликозилированные антитела, ацетилированные антитела, ПЭГирированные антитела, фосфорилированные антитела и амидированные антитела.

Минорные вариации в аминокислотных последовательностях антител в соответствии с изобретением рассматриваются как охваченные настоящим изобретением при условии того, что вариации аминокислотной(ых) последовательности(ей) поддерживают, по меньшей мере, 75%, более предпочтительно

по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с антителом в соответствии с изобретением или его антигенсвязывающим фрагментом, определенным здесь.

Антитела в соответствии с изобретением могут включать варианты, в которых аминокислотные остатки одних видов заменяются на соответствующий остаток других видов в консервативной или не консервативной позициях. В одном из воплощений аминокислотные остатки в не консервативных позициях заменены на консервативные или не консервативные остатки. В частности, рассматриваются консервативные аминокислотные замены.

«Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий похожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи, определены в области техники, включающие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин или гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота), не заряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин или цистеин), не полярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин или триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан или гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде заменена на другую аминокислоту из того же самого семейства боковых цепей, тогда аминокислотную замену рассматривают как консервативную. Включение консервативно модифицированных вариантов в антителе в соответствии с изобретением не исключают другие формы варианта, например, полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели.

«Не консервативные аминокислотные замены» включают замены, в которых (1) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь (например, Arg, His или Lys) заменен на электроотрицательный остаток или им (например, Glu или Asp), (2) гидрофильный остаток (например, Ser или Thr) заменен на гидрофобный остаток или им (например, Ala, Leu, Ile, Phe или Val), (3) цистеин или пролин заменен на любой другой остаток или им, или (4) остаток, имеющий объемную гидрофобную или ароматическую

боковую цепь (например, Val, His, Ile или Trp), заменен на остаток, имеющий меньшую боковую цепь или им (например, Ala или Ser), или с отсутствием боковой цепи (например, Gly).

Формат антитела

Форматы мультиспецифических (например, биспецифических) антител известны в области техники. Например, форматы биспецифического антитела описаны в Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126- 1136, Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) и Cuesta AM *et al.*, Trends Biotech 28 (2011) 355-362.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут иметь любой формат. Форматы мультиспецифического (например, биспецифического) антитела включают, например, мультивалентные одноцепочечные антитела, диатела и триатела, и антитела, имеющие константную структуру домена полноразмерных антител, с которыми дополнительные антигенсвязывающие домены (например, одноцепочечный Fv, tandemный scFv, домен VH и/или домен VL, Fab или (Fab)₂,) связаны через один или более чем один пептидный линкер, а также миметики антитела, такие как DARPIn (сконструированный белок с анкириновым повтором). В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением имеют формат scFv, такие как привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BITE[®]). В некоторых воплощениях антитела в соответствии с изобретением представляют собой одноцепочечные антитела, которые включают первый домен, который связывается с ВСМА, второй домен, который связывается с Т-клеточным антигеном (например, CD3), и третий домен, который включает два полипептидных мономера, каждый из которых включает шарнир, домен СН2 и домен СН3, причем два полипептидных мономера конденсированы друг с другом посредством пептидного линкера (например, (шарнир-СН2-СН3-линкер-шарнир-СН2-СН3).

«Валентность» антитела обозначает количество связывающих доменов. Сами термины «двухвалентные», «трехвалентные» и «мультивалентные» обозначают присутствие соответственно двух связывающих доменов, трех связывающих доменов и множества связывающих доменов. Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут иметь больше чем один связывающий

домен, способный связываться с каждым антигеном-мишенью (т.е. антитело является трехвалентным или мнововалентным). В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением имеют больше чем один связывающий домен, способный связываться с тем же самым эпитопом каждого антигена-мишени. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением имеют больше чем один связывающий домен, способный связываться с различными эпитопами на каждом антигене-мишени.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть двухвалентными, трехвалентными или тетравалентными. В предпочтительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело является трехвалентным, предпочтительно, причем трехвалентное антитело является двухвалентным в отношении ВСМА. Таким образом, биспецифическое антитело может быть трехвалентным, причем трехвалентное антитело является двухвалентным в отношении ВСМА.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела могут быть полноразмерными из одного вида или могут быть химерными или гуманизированными. Для антитела, имеющего больше чем два антигенсвязывающих домена некоторые связывающие домены могут быть идентичны до тех пор, пока белок имеет связывающие домены для двух отличающихся антигенов.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут иметь биспецифический гетеродимерный формат. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело включает две отличающиеся тяжелые цепи и две отличающиеся легкие цепи. В других воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает две идентичные легкие цепи и две отличающиеся тяжелые цепи. В некоторых воплощениях в мультиспецифических (например, биспецифических) антителах в соответствии с изобретением одна из двух пар тяжелой цепи и легкой цепи (НС/LC) специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с ВСМА.

В воплощениях, в которых биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются двухвалентными, они могут включать одно антитело против ВСМА и одно антитело против CD3 (названные здесь как формат «1+1»).

В воплощениях, в которых антитела против ВСМА и CD3 представляют собой Fab, двухвалентное биспецифическое антитело в формате 1+1 может иметь формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-фрагмент отсутствует). Альтернативно, биспецифическое антитело может иметь формат: Fc-фрагмент – Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fc- Fab-фрагменты антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fc-фрагмент – Fab-фрагмент антитела против CD3 (т.е. когда присутствует Fc-фрагмент). В предпочтительных воплощениях двухвалентные биспецифические антитела имеют формат Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fc-фрагмент – Fab-фрагмент антитела против CD3.

«Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает, что Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой N-конец с C-концом Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

«Fc – Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против CD3» означает то, что Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой C-конец с N-концом Fc-фрагмента, и Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой C-конец с N-концом Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

«Fc – Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает то, что Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой C-конец с N-концом Fc-фрагмента, и Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой C-конец с N-концом Fab-фрагмента антитела против CD3.

«Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fc-фрагмент – Fab-фрагмент антитела против CD3» означает то, что Fab-фрагменты антитела ВСМА и Fab-фрагмент антитела против CD3 связываются через свои C-концы с N-концом Fc-фрагмента.

В воплощениях, в которых биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются трехвалентными, они могут включать два антитела против ВСМА и одно антитело против CD3 (называемые здесь как формат «2+1»).

В воплощениях, в которых антитела против ВСМА и CD3 представляют собой Fab-фрагменты, трехвалентные биспецифические антитела в формате 2+1 могут иметь формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 – Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против ВСМА; или Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-

фрагмент отсутствует). Альтернативно, биспецифические антитела могут иметь формат: Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-фрагмент отсутствует). В предпочтительных воплощениях трехвалентные биспецифические антитела имеют формат Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА.

«Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает то, что Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой C-конец с N-концом первого Fab-фрагмента антитела против ВСМА, и первый Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой C-конец с N-концом второго Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

«Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает то, что Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой C-конец с N-концом Fab-фрагмента антитела против CD3, и Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой C-конец с N-концом второго Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

«Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает то, что первый Fab-фрагмент антитела против ВСМА и Fab-фрагмент антитела против CD3 связаны через свои C-концы с N-концом Fc-фрагмента, и второй Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой C-конец с N-концом Fab-фрагмента антитела против CD3.

«Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3» означает то, что первый Fab-фрагмент антитела против ВСМА и второй Fab-фрагмент антитела против ВСМА связаны через свои C-концы с N-концом Fc-фрагмента, и Fab-фрагмент антитела против CD3 связывается через свой C-конец с N-концом второго Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

«Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА – Fab-фрагмент антитела против ВСМА» означает то, что Fab-фрагмент

антитела против CD3 и первый Fab-фрагмент антитела против ВСМА связаны через свои С-концы с N-концом Fc-фрагмента, и второй Fab-фрагмент антитела против ВСМА связывается через свой С-конец с N-концом первого Fab-фрагмента антитела против ВСМА.

В некоторых воплощениях биспецифические антитела в соответствии с изобретением могут включать не более чем один Fab-фрагмент антитела против ВСМА, специфически связывающийся с ВСМА, и не более чем один Fab-фрагмент антитела против CD3, специфически связывающийся с CD3 и не более чем одной частью Fc-фрагмента.

В некоторых воплощениях биспецифическое антитело включает не более чем один Fab-фрагмент антитела против CD3, специфически связывающийся с CD3, не более чем один Fab-фрагмент антитела против ВСМА, специфически связывающийся с ВСМА, и не более чем одну часть Fc. В некоторых воплощениях не более чем один Fab-фрагмент антитела против CD3 и не более чем один Fab-фрагмент антитела против ВСМА связаны с частью Fc, и связь осуществляется путем С-концевого связывания Fab-фрагмента с шарнирной областью части Fc. В некоторых воплощениях второй Fab-фрагмент антитела против ВСМА связан через свой С-конец с N-концом Fab-фрагмента антитела против CD3 или с шарнирной областью части Fc и, таким образом, между частью Fc биспецифического антитела и Fab-фрагментом антитела против CD3.

В воплощениях, включающих два Fab-фрагмента антитела против ВСМА, Fab-фрагменты антитела против ВСМА предпочтительно получены из одного и того же антитела и предпочтительно идентичны по последовательностям CDR, последовательностям VH и VL варибельного домена и/или последовательностям CH1 и CL константного домена. Предпочтительно, аминокислотные последовательности двух Fab-фрагментов антитела против ВСМА являются идентичными.

Биспецифические антитела в соответствии с изобретением также могут включать scFvs вместо Fab-фрагмента. Таким образом, в некоторых воплощениях биспецифические антитела имеют любой из вышеприведенных форматов, причем каждый Fab-фрагмент замещен на соответствующую scFv.

Компоненты, например, Fab-фрагменты биспецифических антител в соответствии с изобретением могут быть химически связаны вместе путем использования подходящего линкера в соответствии с уровнем техники. В

предпочтительных воплощениях используют линкер (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Используемые здесь термины «химически связанный» (или «связанный») означают то, что компоненты связаны при помощи ковалентной связи. В качестве линкера предполагается пептидный линкер, таким образом, что ковалентное связывание обычно осуществляют при помощи способов биохимической рекомбинации. Например, связывание может быть осуществлено с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей домены VL и/или VH соответствующих Fab-фрагментов, линкер и часть цепи Fc, если антитело включает Fc.

В случае, когда используют линкер, тогда этот линкер может иметь длину и последовательность, достаточные для обеспечения того, что каждый из первого и второго доменов могут независимо друг от друга сохранять свои специфичности дифференциального связывания.

Последовательности антитела

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранных из группы:

а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:23, области CDR2L с SEQ ID NO:24 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

в) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

г) области CDR1H с SEQ ID NO:29, области CDR2H с SEQ ID NO:30, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

д) области CDR1H с SEQ ID NO:34, области CDR2H с SEQ ID NO:35, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

е) области CDR1H с SEQ ID NO:36, области CDR2H с SEQ ID NO:37, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33; и

ж) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18, области CDR2L с SEQ ID NO:19 и области CDR3L с SEQ ID NO:20.

В любом из раскрытых здесь воплощений область CDR1L с SEQ ID NO:18 может быть заменена на область CDR1L с SEQ ID NO:67, и область CDR2L с SEQ ID NO:19 может быть заменена на область CDR2L с SEQ ID NO:68. Соответственно, в некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело может включать антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:15, область CDR2H с SEQ ID NO:16, область CDR3H с SEQ ID NO:17, область CDR1L с SEQ ID NO:67, область CDR2L с SEQ ID NO:68 и область CDR3L с SEQ ID NO:20.

В любом из раскрытых здесь воплощений область CDR1L с SEQ ID NO:27 может быть заменена на область CDR1L с SEQ ID NO:71; и область CDR2L с SEQ ID NO:28 может быть заменена на область CDR2L с SEQ ID NO:72. Соответственно, в некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело может включать антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22, область CDR3H с SEQ ID NO:17, область CDR1L с SEQ ID NO:71, область CDR2L с SEQ ID NO:72 и область CDR3L с SEQ ID NO:20;

В любом из раскрытых здесь воплощений область CDR1L с SEQ ID NO:25 может быть заменена на область CDR1L с SEQ ID NO:69; и область CDR2L с SEQ ID NO:26 может быть заменена на область CDR2L с SEQ ID NO:70. Соответственно, в некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело может включать антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22, область CDR3H с SEQ

ID NO:17, область CDR1L с SEQ ID NO:69, область CDR2L с SEQ ID NO:70 и область CDR3L с SEQ ID NO:20.

В предпочтительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранных из:

а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20; или

в) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18, области CDR2L с SEQ ID NO:19 и области CDR3L с SEQ ID NO:20.

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH, включающую область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22 и область CDR3H с SEQ ID NO:17, и область VL, включающую область CDR1L с SEQ ID NO:27, область CDR2L с SEQ ID NO:28 и область CDR3L с SEQ ID NO:20. В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

- а) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:12,
- б) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:13,
- в) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:14,
- г) области VH с SEQ ID NO:38 и области VL с SEQ ID NO:12,
- д) области VH с SEQ ID NO:39 и области VL с SEQ ID NO:12,
- е) области VH с SEQ ID NO:40 и области VL с SEQ ID NO:12 или
- ж) области VH с SEQ ID NO:9 и области VL с SEQ ID NO:11.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

а) VH, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и VL, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14;

б) VH, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и VL, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13; или

в) VH, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и VL, включающей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

- а) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:13,
- б) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:14 или
- в) области VH с SEQ ID NO:9 и области VL с SEQ ID NO:11.

В особенно предпочтительных воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает область VH с SEQ ID NO:10 и область VL с SEQ ID NO: 14.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Примеры антител против CD3 включают ОКТ3, TR66, APA 1/1, SP34, CH2527, WT31, 7D6, UCHT-1, Leu-4, BC-3, H2C, HuM291 (визилизумаб), Hu291 (PDL), ChAglyCD3 (отеликсизумаб), hОКТ3 γ 1(Ala-Ala) (теплизумаб) и NI-0401 (форалумаб).

Первое полученное антитело против CD3 представляло собой ОКТ3 (муромонаб-CD3), представляющее собой мышинное антитело, связывающееся с доменом CD3 ϵ . Последующие антитела против CD3 включают гуманизированные или человеческие антитела, и сконструированные антитела, например, антитела, включающие модифицированные области Fc.

Антитела против CD3 могут распознавать эпитоп на одной полипептидной цепи, например, APA 1/1 или SP34 (Yang SJ, *The Journal of Immunology* (1986) 137; 1097-1100), или конформационный эпитоп, расположенный на двух или более чем двух субъединицах CD3, например, WT31, 7D6, UCHT-1 (смотри WO2000041474) и Leu-4. Клинические исследования осуществляли с использованием нескольких антител против CD3, включающих BC-3 (Anasetti et al., *Transplantation* 54: 844 (1992) и H2C (WO2008119567A2). Антитела против CD3 антитела в клинических испытаниях включают HuM291 (визилизумаб) (Norman et al., *Transplantation*. 2000 Dec 27;70(12):1707-12.) Hu291 (PDL), ChAglyCD3 (отеликсизумаб) (H Waldmann), hОКТ3 γ 1(Ala-Ala) (теплизумаб) (J Bluestone и Johnson and Johnson) и (NI-0401) форалумаб.

Любое антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть подходящими для применения в мультиспецифических (например, биспецифических) антителах в соответствии с настоящим изобретением. Например, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела могут включать антитело против CD3, выбранное из ОКТ3, TR66, APA 1/1, SP34, CH2527, WT31, 7D6, UCHT-1, Leu-4, BC-3, H2C, HuM291 (визилизумаб), Hu291 (PDL), ChAglyCD3 (отеликсизумаб), hОКТ3 γ 1(Ala-Ala) (теплизумаб) и NI-0401 (форалумаб). В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением включает гуманизированное антитело SP34 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых предпочтительных воплощениях антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены из SP34 и могут иметь похожие

последовательности и одни и те же свойства в отношении связывающегося с антителом SP34 эпитопа.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий переменный домен VH, включающий CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, 2 и 3 в виде, соответственно, тяжелой цепи CDR1H, CDR2H и CDR3H, и переменный домен VL, включающий CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 в виде, соответственно, легкой цепи CDR1L, CDR2L и CDR3L.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий переменные домены с SEQ ID NO:7 (VH) и SEQ ID NO:8 (VL). В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий переменную область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, и переменную область VL, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранную из группы:

(а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:23, области CDR2L с SEQ ID NO:24 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(в) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(г) области CDR1H с SEQ ID NO:29, области CDR2H с SEQ ID NO:30, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

(д) области CDR1H с SEQ ID NO:34, области CDR2H с SEQ ID NO:35, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33;

(е) области CDR1H с SEQ ID NO:36, области CDR2H с SEQ ID NO:37, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33; или

(ж) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18, области CDR2L с SEQ ID NO:19 и области CDR3L с SEQ ID NO:20,

и антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:1, область CDR2H с SEQ ID NO:2, область CDR3H с SEQ ID NO:3, область CDR1L с SEQ ID NO:4, область CDR2L с SEQ ID NO:5 и область CDR3L с SEQ ID NO:6.

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает:

антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH, включающую область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22 и область CDR3H с SEQ ID NO:17, и область VL, включающую область CDR1L с SEQ ID NO:27, область CDR2L с SEQ ID NO:28 и область CDR3L с SEQ ID NO:20; и

антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:1, область CDR2H с SEQ ID NO:2, область CDR3H с SEQ ID NO:3, область CDR1L с SEQ ID NO:4, область CDR2L с SEQ ID NO:5 и область CDR3L с SEQ ID NO:6.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

- (а) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:12;
- (б) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:13;
- (в) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:14;

- (г) области VH с SEQ ID NO:38 и области VL с SEQ ID NO:12;
- (д) области VH с SEQ ID NO:39 и области VL с SEQ ID NO:12;
- (е) области VH с SEQ ID NO:40 и области VL с SEQ ID NO:12; или
- (ж) области VH с SEQ ID NO:9 и области VL с SEQ ID NO:11, и

антитела против CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего область VH с SEQ ID NO:7 и область VL с SEQ ID NO:8.

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH с SEQ ID NO:10 и область VL с SEQ ID NO:14, и антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий область VH с SEQ ID NO:7 и область VL с SEQ ID NO:8.

В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий CDR3H, CDR3L, CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L одного из GSK2857916, AMG-420, AMG-701, JNJ-957, JNJ-64007957, PF-06863135, REGN-5458 или TNB-383B. В некоторых воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH и VL одного из GSK2857916, AMG-420, AMG-701, JNJ-957, JNJ-64007957, PF-06863135, REGN-5458 или TNB-383B.

Fc

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут иметь Fc или могут не иметь Fc. В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают Fc, предпочтительно, человеческую Fc.

В некоторых воплощениях Fc представляет собой вариант Fc, например, последовательность Fc, которая модифицирована (например, путем аминокислотной замены, делеции и/или вставки) по сравнению с родительской последовательностью Fc (например, не модифицированным полипептидом Fc, который затем модифицируют для образования варианта) для обеспечения желаемых структурных свойств и/или биологической активности.

Соответственно, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать Fc, включающую одну или более чем одну

модификацию, как правило, для изменения одного или более чем одного функционального свойства антитела, такого как период полувыведения из сыворотки крови, связывание комплемента, связывание с рецептором Fc и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Fc может быть связана с антителом против ВСМА и/или фрагментами Fab антитела против CD3 в антителе в соответствии с изобретением.

Присутствие обладает преимуществом, заключающимся в удлинении периода полувыведения антитела. Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут обладать периодом полувыведения у мышей или яванских макак, предпочтительно яванских макак, более чем 12 часов, предпочтительно 3 суток или больше. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением обладают периодом полувыведения, составляющим приблизительно от 1 до 12 суток, что дает возможность для введения, по меньшей мере, один или два раза в неделю.

Уменьшенная эффекторная функция

Предпочтительно, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают область Fc (например, подкласса IgG1), которая включает модификации для того, чтобы избежать связывания FcR и C1q и минимизации ADCC/CDC. Последнее обеспечивает преимущество, заключающееся в том, что биспецифическое антитело опосредует свою эффективность уничтожения опухолевых клеток исключительно за счет мощного механизма эффекторной клетки, например, перенацеливания/активации Т-клетки. Таким образом, избегают дополнительных механизмов действия, таких как действия в отношении системы комплемента и в отношении эффекторных клеток, экспрессирующих FcR, и уменьшается риск побочных действий, таких как реакции, связанные с инфузией.

В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают IgG, в частности, IgG1, где область Fc включает модификации L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Гетеродимеризация

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут представлять собой гетеромультимерные антитела. Такие гетеромультимерные антитела могут включать модификации в областях, вовлеченных в

взаимодействия между цепями антитела для того, чтобы способствовать правильной сборке антител.

Например, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать Fc, имеющую одну или более чем одну модификацию в домене CH2 и CH3 для усиления гетеродимеризации Fc. Альтернативно или дополнительно мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать модификации в области CH1 и CL для того, чтобы способствовать предпочтительному спариванию между тяжелой цепью и легкой цепью Fab-фрагмента.

Существует множество стратегий, способствующих гетеродимеризации. Эти стратегии могут включать введение ассиметрических комплементарных модификаций в каждую из двух цепей антитела, таким образом, что обе цепи совместимы друг с другом и, таким образом, способны образовывать гетеродимер, но каждая цепь не способна димеризоваться сама с собой. Такие модификации могут охватывать вставки, делеции, консервативные и не консервативные замены и перегруппировки.

Гетеродимеризации может способствовать вставка заряженных остатков для того, чтобы создать благоприятные электростатические взаимодействия между цепью первого антитела и цепью второго антитела. Например, одна или более чем одна положительно заряженная аминокислота может быть вставлена в цепь первого антитела, и одна или более чем одна отрицательно заряженная аминокислота может быть вставлена в соответствующие позиции в цепи второго антитела.

Альтернативно или дополнительно гетеродимеризации может способствовать введение стерического барьера между вступающими в контакт остатками. Например, один или более чем один остаток с объемной боковой цепью может быть вставлен в цепь первого антитела, и один или более чем один остаток, способный вмещать объемную боковую цепь, может быть вставлен в цепь второго антитела.

Альтернативно или дополнительно гетеродимеризации может способствовать введение одной или более чем одной модификации в гидрофильные и гидрофобные остатки на границе контакта между цепями для того, чтобы сделать образование гетеродимера более энтропически и энтальпически благоприятным, чем образование гомодимера.

Еще одна стратегия, способствующая гетеродимеризации, заключается в перегруппировке фрагментов цепей антител таким образом, что каждая цепь остается совместимой только с цепью, включающей соответствующие перегруппировки. Например, технология CrossMAb основана на кроссоверных доменах антител, обеспечивая правильную ассоциацию цепей. Существуют три основных формата CrossMAb, они представляют собой: (1) CrossMAb^{Fab}, при котором VH и VL обмениваются и CH1 и CL обмениваются; (2) CrossMAb^{VH-VL}, при котором VH и VL обмениваются; и (3) CrossMAb^{CH1-CL}, при котором CH1 и CL обмениваются (Klein et al., 2016. MABS, 8(6):1010-1020).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать замену VH и VL. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать обмен CH1 и CL. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать обмен VH и VL и обмен CH1 и CL.

В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают обмен VH и VL.

Другие подходы, способствующие гетеродимеризации, включают применение домена, сконструированного путем обмена между цепями (SEED) (Davis et al., 2010. Protein Eng Des Sel, 23 (4); 195–202).

Комбинация вышеприведенных стратегий может быть использована для максимизации эффективности сборки при минимизации влияния на стабильность антитела.

Гетеродимеризация Fc

В некоторых воплощениях мультиспецифических (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут иметь гетеродимерные Fc, например, они могут включать одну тяжелую цепь, полученную из антитела против ВСМА, и одну тяжелую цепь, полученную из антитела против CD3.

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать гетеродимерную Fc, которая включает одну или более чем одну модификацию, которая способствует ассоциации первого домена CH2 и/или CH3 со вторым доменом CH2 и/или CH3. В предпочтительных воплощениях одна или более

чем одна модификация способствует ассоциации первого домена СНЗ со вторым доменом СНЗ, например, приводящей в результате к ассиметрическим модификациям в домене СНЗ. Одна или более чем одна модификация может включать модификации, выбранные из аминокислотных вставок, делеций, консервативных и не консервативных замен и перегруппировок, и их комбинаций.

Как правило, как первый домен СНЗ, так и второй домен СНЗ сконструированы комплементарным образом, таким что каждый домен СНЗ (или включающая его тяжелая цепь) больше не может гомодимеризоваться сам с собой, но это будет способствовать гетеродимеризации с сконструированным комплементарным другим доменом СНЗ (таким образом, что первый и второй домены СНЗ гетеродимеризуются, и не образуются гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми доменами СНЗ).

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать Fc, имеющую одну или более чем одну модификацию «выступ-во-впадину», которые подробно описаны с некоторыми примерами, например, в WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621, Merchant, A.M. et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68, и WO 98/050431.

В этом способе поверхности взаимодействия двух доменов СНЗ изменены для увеличения гетеродимеризации обеих цепей Fc, содержащих эти два домена СНЗ. Один из двух доменов СНЗ (двух цепей Fc) может представлять собой «выступ», тогда как другой представляет собой «впадину».

Соответственно, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать два домена СНЗ, причем каждый из первого домена СНЗ первой цепи Fc и второго домена СНЗ второй цепи Fc соприкасаются на границе, которая включает исходную границу между доменами СНЗ антитела, причем указанная граница изменена таким образом, чтобы способствовать образованию антитела.

В некоторых воплощениях:

- 1) домен СНЗ первой цепи Fc изменен таким образом, что в пределах исходной поверхности контакта домена СНЗ первой цепи Fc, который контактирует с исходной поверхностью контакта домена СНЗ другой цепи Fc, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, обладающий боковой цепью большего объема, таким образом, образуя выступ в пределах поверхности домена СНЗ первой цепи Fc,

которая располагается в полости в пределах поверхности контакта домена СНЗ другой цепи Fc; и

2) домен СНЗ другой цепи Fc изменен таким образом, что в пределах исходной поверхности контакта домена СНЗ другой цепи Fc, который контактирует с исходной поверхностью контакта домена СНЗ первой цепи Fc, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, обладающий боковой цепью меньшего объема, таким образом, образуя полость в пределах поверхности домена СНЗ другой цепи Fc, в которой располагается выступ в пределах поверхности контакта домена СНЗ первой цепи Fc.

Предпочтительно, указанный аминокислотный остаток, обладающий более объемной боковой цепью, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификацию(и) в позициях T366, L368 и Y407, например, T366S, L368A и Y407V (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают второй домен СНЗ, включающий модификацию в позиции T366 («модификация выступа»), например, T366W (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификации T366S, L368A и Y407V или их консервативные замены, и второй домен СНЗ, включающий модификацию T366W или ее консервативную замену (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В одном из воплощений мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификацию, изложенную в таблице 2, и второй домен СНЗ, включающий модификации, изложенные в таблице 2.

Таблица 2: Модификация “выступ во впадине”

Первый домен СНЗ	Второй домен СНЗ
------------------	------------------

КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU	КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU
T389S	T366S	T389W	T366W
L391A	L368A		
Y438V	Y407V		

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать одну или более чем одну из модификаций, изложенных в патентах США 9562109 и 9574010 (включенных здесь путем ссылки).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий одну или более чем одну модификацию в позициях T350, L351, F405 и/или Y407 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), например, T350V, L351Y, F405A и/или Y407V. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификацию(и) в позициях T350, L351, F405 и Y407 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), например, T350V, L351Y, F405A и Y407V.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают второй домен СНЗ, включающий одну или более чем одну модификацию в позициях T350, T366, K392 и/или T394 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), например, T350V, T366L, K392L и/или T394W. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают второй домен СНЗ, включающий модификацию(и) в позициях T350, T366, K392 и T394 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), например, T350V, T366L, K392L и T394W.

В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий одну или более чем одну модификацию в позициях T350, L351, F405 и/или Y407 (например, T350V, L351Y, F405A и/или Y407V) и второй домен СНЗ, включающий одну или более чем одну модификацию в позициях T350, T366, K392 и/или T394 (например, T350V, T366L, K392L и/или T394W) (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификацию(и) в позициях Т350, L351, F405 и Y407 (например, Т350V, L351Y, F405A и Y407V), и второй домен СНЗ, включающий модификацию(и) в позициях Т350, Т366, К392 и Т394 (например, Т350V, Т366L, К392L и Т394W) (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Одна или более чем одна модификация может модифицировать электростатические заряды, гидрофобные/гидрофильные взаимодействия и/или стерическое взаимодействие между боковыми цепями.

В особенно предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификации Т350V, L351Y, F405A и Y407V или их консервативные замены, и второй домен СНЗ, включающий модификации Т350V, Т366L, К392L и Т394W или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В одном из воплощений мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают первый домен СНЗ, включающий модификации, изложенные в таблице 3, и второй домен СНЗ, включающий модификации, изложенные в таблице 3.

Таблица 3: Модификации гетеродимеризации Fc

Первый домен СНЗ		Второй домен СНЗ	
КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU	КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU
T371V	T350V	T371V	T350V
L372Y	L351Y	T389L	T366L
F436A	F405A	K420L	K392L
Y438V	Y407V	T422W	T394W

Другие способы модификации СНЗ для усиления гетеродимеризации рассматриваются как альтернативы в соответствии с изобретением и описаны, например, в WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901,

WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012/058768, WO2013/157954, WO2013/157953 и WO2013/096291.

В некоторых воплощениях биспецифическое антитело в соответствии с изобретением имеет изотип IgG2 и может быть использован подход гетеродимеризации, описанный в WO2010/129304.

Другие модификации Fc

В некоторых воплощениях биспецифические антитела в соответствии с изобретением могут включать Fc, причем оба домена СНЗ изменены путем вставки цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие позиции каждого домена СНЗ таким образом, что может образовываться дисульфидная мостиковая связь между обоими доменами СНЗ. Цистеины могут быть вставлены в положении 349 в одном из доменов СНЗ и в положении 354 в другом домене СНЗ (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Предпочтительно, цистеин, вставленный в положение 354, находится в первом домене СНЗ, и цистеин, вставленный в положение 349, находится во втором домене СНЗ (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Fc могут включать модификации, такие как D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I (нумерация в соответствии с нумерацией EU). Предпочтительно, оба домена СНЗ включают D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Гетеродимеризация легкой и тяжелой цепей

В мультиспецифических (например, биспецифических) антителах в соответствии с изобретением одна или более чем одна из тяжелых цепей и легких цепей иммуноглобулина может включать одну или более чем одну модификацию, например, аминокислотные модификации, которые могут способствовать предпочтительному спариванию конкретной тяжелой цепи с конкретной легкой цепью, когда тяжелые цепи и легкие цепи экспрессируются или продуцируются вместе. Такие модификации могут обеспечить значительное улучшение продукции/очистки без изменения биологических свойств, таких как связывание с ВСМА. В частности, путем внедрения одной или более чем одной модификации, такой как аминокислотные замены, ошибки спаривания легкой цепи и образование побочных продуктов при получении может быть значительно уменьшено и, таким образом, увеличен выход и облегчена очистка.

Одна или более чем одна модификация может способствовать предпочтительному гетеродимерному спариванию за счет введения стерического барьера, замен заряженных аминокислот на противоположно заряженные и/или путем гидрофобных или гидрофильных взаимодействий. В предпочтительных воплощениях одна или более чем одна модификация способствует предпочтительному гетеродимерному спариванию путем введения стерического барьера и замены(замен) заряженных аминокислот на противоположно заряженные.

Аминокислотные замены могут представлять собой замены заряженных аминокислот на противоположно заряженные (например, на границе контакта СН1/СL), что уменьшает ошибочное спаривание легкой цепи, например, побочные продукты, имеющие тип белка Бенс-Джонса.

В предпочтительных воплощениях одна или более чем одна модификация, способствующая гетеродимеризации легкой и тяжелой цепей, представляют собой аминокислотные модификации в легкой и тяжелой цепях за пределами CDR.

Одна или более чем одна модификация может быть представлена в антителе против ВСМА или его антигенсвязывающем фрагменте. Альтернативно, одна или более чем одна модификация может быть представлена в антителе против CD3 или его антигенсвязывающем фрагменте. В предпочтительных воплощениях одна или более чем одна модификация представлена в антителе против ВСМА или его антигенсвязывающем фрагменте.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают тяжелую цепь иммуноглобулина, включающую домен СН1, имеющий аминокислотные модификации К147Е/Д и К213Е/Д (нумерация в соответствии с нумерацией ЕU), и соответствующая легкая цепь иммуноглобулина включает домен СL, имеющий аминокислотные модификации Е123К/Р/Н и Q124К/Р/Н (нумерация в соответствии с Кабатом). Предпочтительно, домен СН1 включает аминокислотные модификации К147Е и К213Е (нумерация в соответствии с нумерацией ЕU) или их консервативные замены, и соответствующий домен СL включает аминокислотные модификации Е123Р и Q124К или их консервативные замены (нумерация в соответствии с Кабатом). Такие мультиспецифические (например, биспецифические) антитела могут быть получены с высоким выходом и могут быть легко очищены.

В одном из воплощений аминокислотные модификации, описанные в таблице 4, могут находиться в антителе против ВСМА или в антителе против CD3.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются двухвалентными, и включают одно антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент и одно антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (формат «1+1»), причем:

(а) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 4; или

(б) антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные и включают два антитела против ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты и одно антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (формат «2+1»), причем:

(а) одно или оба антитела против ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты (например, Fab-фрагменты антитела против ВСМА) включают домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 4; или

(б) антитело против CD3 (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 4.

В частности, каждое антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) может включать домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации:

Таблица 4: Модификации путем гетеродимеризации легкой и тяжелой цепей

Домен СН1	Домен СL
-----------	----------

КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU	КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU
K145E	K147E	E123R	E123R
K221E	K213E	Q124K	Q124K

В предпочтительном воплощении мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают модификации, изложенные в таблице 4, в комбинации с модификациями, изложенными в таблице 2. Таким образом, в одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются двухвалентными и включают:

(а) одно антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент и одно антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (формат «1+1»), при котором (1) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен CH1, который включает аминокислотные модификации K147E и K213E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации E123R и Q124K (т.е. модификации, изложенные в таблице 4), или (2) антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен CH1, который включает аминокислотные модификации K147E и K213E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации E123R и Q124K (т.е. модификации, изложенные в таблице 4); и

(б) первый домен CH3, включающий модификации T366S, L368A и Y407V, и второй домен CH3, включающий модификацию T366W (т.е. модификации, изложенные в таблице 2).

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные и включают:

(а) два антитела против ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты и одно антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (формат «2+1»), причем (1) одно или оба антитела против ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты (например, Fab-фрагменты антитела против ВСМА) включает домен CH1, который включает аминокислотные модификации K147E и K213E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации E123R и Q124K (т.е. модификации, изложенные в таблице 4), или (2) антитело против CD3 или его антигенсвязывающий

фрагмент (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, который включает аминокислотные модификации K147E и K213E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации E123R и Q124K (т.е. модификации, изложенные в таблице 4); и

(б) первый домен СН3, включающий модификации T366S, L368A и Y407V, и второй домен СН3, включающий модификацию T366W (т.е. модификации, изложенные в таблице 2).

В частности, каждое антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) может включать домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4, и соответствующий домен CL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 4. В предпочтительных воплощениях первая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом первого антитела против ВСМА, и вторая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом антитела против CD3.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают тяжелую цепь иммуноглобулина, включающую домен СН1, имеющий аминокислотные модификации по одной или более чем одной из позиций A141, L145, K147, Q175 (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и соответствующая легкая цепь иммуноглобулина включает домен CL, имеющий аминокислотные модификации по одной или более чем одной из позиций F116, Q124, L135, T178 (нумерация в соответствии с Кабатом). Предпочтительно, домен СН1 включает аминокислотные модификации A141W, L145E, K147T, Q175E или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU), и соответствующий домен CL включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V, T178R или их консервативные замены (нумерация в соответствии с Кабатом).

В одном из воплощений мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующая легкая цепь иммуноглобулина включает домен CL, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5. В воплощениях, в которых мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением и антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с

изобретением, аминокислотные модификации, описанные в таблице 5, могут находиться в антителе против ВСМА или в антителе против CD3.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются двухвалентными и включают одно антитело против ВСМА и одно антитело против CD3 (формат «1+1»), причем:

(а) антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5; или

(б) антитело против CD3 (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные и включают два антитела против ВСМА и одно антитело против CD3 (формат «2+1»), причем:

(а) одно или оба антитела против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 5; или

(б) антитело против CD3 (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 5.

В конкретных предпочтительных воплощениях каждое антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) может включать домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющие аминокислотные модификации в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5: Модификации путем гетеродимеризации легкой и тяжелой цепей

Домен СН1		Домен СL	
КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU	КАБАТ	НУМЕРАЦИЯ EU

A139W	A141W	F116A	F116A
L143E	L145E	Q124R	Q124R
K145T	K147T	L135V	L135V
Q179E	Q175E	T178R	T178R

В предпочтительном воплощении мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, в комбинации с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 3. Таким образом, в одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением являются двухвалентными и включают:

(а) одно антитело против ВСМА и одно антитело против CD3 (формат «1+1»), причем (1) антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен CH1, который включает аминокислотные модификации A141W, L145E, K147T и Q175E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (т.е. модификации, изложенные в таблице 5), или (2) антитело против CD3 (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен CH1, который включает аминокислотные модификации A141W, L145E, K147T и Q175E, и соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (т.е. модификации, изложенные в таблице 5); и

(б) первый домен CH3, включающий модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V, и второй домен CH3, включающий модификации T350V, T366L, K392L и T394W (т.е. модификации, изложенные в таблице 3).

В предпочтительных воплощениях первая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом антитела против ВСМА, и вторая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом антитела против CD3.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные и включают:

(а) два антитела против ВСМА и одно антитело против CD3 (формат «2+1»), причем (1) одно или оба антитела против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела

против ВСМА) включает домен СН1, который включает аминокислотные модификации А141W, L145E, K147T и Q175E, и соответствующий домен СL, который включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (т.е. модификации, изложенные в таблице 5), или (2) антитело против CD3 (например, Fab-фрагмент антитела против CD3) включает домен СН1, который включает аминокислотные модификации А141W, L145E, K147T и Q175E, и соответствующий домен СL, который включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (т.е. модификации, изложенные в таблице 5); и

(б) первый домен СН3, включающий модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V, и второй домен СН3, включающий модификации T350V, T366L, K392L и T394W (т.е. модификации, изложенные в таблице 3).

В частности, каждое антитело против ВСМА (например, Fab-фрагмент антитела против ВСМА) включает домен СН1, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5, и соответствующий домен СL, имеющий аминокислотные модификации, изложенные в таблице 5. В предпочтительных воплощениях первая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом первого антитела против ВСМА, и вторая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом антитела против CD3.

Альтернативно, домен СН1 может включать аминокислотную модификацию в позиции Q175 (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и соответствующий домен СL может включать аминокислотные модификации по одной или более чем одной из позиций F116, Q124, L135, T178 (нумерация в соответствии с Кабатом). Домен СН1 может включать аминокислотную модификацию Q175K (нумерация в соответствии с нумерацией EU) или ее консервативную замену, и соответствующий домен СL может включать аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V, T178R (нумерация в соответствии с Кабатом) или их консервативные замены.

В альтернативных воплощениях домен СН1 может включать аминокислотную модификацию в позиции Q175 (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и соответствующий домен СL может включать аминокислотные модификации по одной или более чем одной из позиций Q124, L135, Q160, T180 (нумерация в соответствии с Кабатом). Домен СН1 может включать аминокислотную модификацию Q175K (нумерация в соответствии с нумерацией EU) или ее консервативную замену, и соответствующий домен СL может включать аминокислотные модификации Q124E,

L135W, Q160E и T180E, или их консервативные замены (нумерация в соответствии с Кабатом).

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением дополнительно могут включать аминокислотную замену в положении 49 области VL, выбранную из группы аминокислот тирозина (Y), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и гистидина (H), и/или аминокислотную замену в позиции 74 области VL, которая представляет собой треонин (T) или аланин (A).

CrossMAb

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать технологию CrossMAb. Технология CrossMAb основана на кроссоверных доменах антитела для обеспечения правильной ассоциации цепей. Ее используют для облегчения образования мультиспецифических (например, биспецифических) антител. Существуют три основных формата CrossMAb, они представляют собой: (1) CrossMAb^{Fab}, в котором VH и VL заменены и CH1 и CL заменены; (2) CrossMAb^{VH-VL}, в котором VH и VL заменены; и (3) CrossMAb^{CH1-CL}, в котором CH1 и CL заменены (Klein et al., 2016. MABS, 8(6):1010-1020).

Технология CrossMAb известна в области техники. Биспецифические антитела, в которых переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 заменены друг на друга, описаны в WO2009080251 и WO2009080252.

В одном или более чем одном из антител или антигенсвязывающих фрагментов в мультиспецифических (например, биспецифических) антителах в соответствии с изобретением переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 могут быть заменены друг на друга. В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать замену VH и VL и замену CH1 и CL. Таким образом, мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут включать кроссоверную легкую цепь и кроссоверную тяжелую цепь. Используемый здесь термин «кроссоверная легкая цепь» представляет собой легкую цепь, которая может включать VH-CL, VL-CH1 или VH-CH1. Используемый здесь термин «кроссоверная тяжелая цепь» представляет собой тяжелую цепь, которая может включать VL-CH1, VH-CL или VL-CL.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают:

(а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD3;

и

(б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с ВСМА,

причем переменные домены VL и VH и/или константные домены CL и CH1 заменены друг на друга в (1) антителе против ВСМА; и/или (2) антителе против CD3.

В некоторых воплощениях переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 антитела против CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента заменены друг на друга. Более предпочтительно, переменные домены VL и VH антитела против CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента заменены друг на друга.

В воплощениях, в которых биспецифические антитела в формате 1+1 имеют формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc-фрагмент отсутствует); Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3, биспецифические антитела могут включать формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. Fab-фрагмент антитела против ВСМА может иметь формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. Альтернативно, Fab-фрагмент антитела против CD3 может иметь формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. В предпочтительных воплощениях Fab-фрагмент антитела против CD3 биспецифического антитела включает формат CrossMAb^{VH-VL}.

Особенно предпочтительно то, чтобы биспецифические антитела в соответствии с изобретением, имеющие формат 2+1, включали технологию CrossMAb. Таким образом, в воплощениях, в которых трехвалентные биспецифические антитела в формате 2+1 имеют формат: Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА (т.е. когда Fc отсутствует); Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА; Fab-фрагмент антитела

против ВСМА - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3; или Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fc-фрагмент - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против ВСМА, биспецифические антитела могут включать формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. Fab-фрагмент антитела против ВСМА может иметь формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. Альтернативно, Fab-фрагмент антитела против CD3 может иметь формат CrossMAb, например, CrossMAb^{Fab}, CrossMAb^{VH-VL} или CrossMAb^{CH1-CL}. В предпочтительных воплощениях Fab-фрагмент антитела против CD3 биспецифического антитела включает формат CrossMAb^{VH-VL}.

В некоторых воплощениях биспецифические антитела в соответствии с изобретением, имеющие формат 1+1, не включают технологию CrossMAb, т.е. ни антитело против ВСМА, ни антитело против CD3 не имеет переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1, заменяющие друг друга.

Примеры воплощений

Примеры воплощений изложены на Фиг. 1-3.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмента антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмента антитела против CD3. Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 1А с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела

против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает (а) легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1; и также (б) аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 1В с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Каждый Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 2А с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает (а) легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1; и также (б) аминокислотные

модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 2В с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3. Каждый Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 2С с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает (а) легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1; и также (б) аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 2D с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела

против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 3А с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает (а) легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1; и также (б) аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 3В с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fc - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3. Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает

вариабельный домен VL и константный домен CH1. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 3С с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, один Fab-фрагмент антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fc - Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fab-фрагмент антитела против CD3. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает (а) легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает вариабельный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает вариабельный домен VL и константный домен CH1; и также (б) аминокислотные модификации, изложенные в таблице 4 или таблице 5. Данное воплощение проиллюстрировано на Фиг. 3D с аминокислотными модификациями, изложенными в таблице 4.

В одном из воплощений антитела, проиллюстрированные на Фиг. 2, дополнительно включают модификации, изложенные в таблице 2 или таблице 3. Например, антитела, проиллюстрированные на Фиг. 2, могут включать модификации, изложенные в таблице 4, в комбинации с модификациями, изложенными в таблице 2. Альтернативно, антитела, проиллюстрированные на Фиг. 2, могут включать модификации, изложенные в таблице 5, в комбинации с модификациями, изложенными в таблице 3.

В одном из воплощений биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмента антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает вариабельный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает вариабельный домен VL и константный домен CH1. Каждый Fab-фрагмент

антитела против ВСМА включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем тяжелая цепь включает домен СН1, который включает аминокислотные модификации К147Е и К213Е (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и причем легкая цепь включает соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации E123R и Q124K (нумерация в соответствии с Кабатом) (т.е. модификации, изложенные в таблице 4). Часть Fc включает первую цепь Fc и вторую цепь Fc, причем первая цепь Fc включает первый константный домен СН2 и первый константный домен СН3, а вторая цепь Fc включает второй константный домен СН2 и второй константный домен СН3. Первая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом первого Fab-фрагмента антитела против ВСМА, а вторая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом Fab-фрагмента антитела против CD3. Первый домен СН3 включает модификации T366S, L368A, и Y407V («модификации впадины») и второй домен СН3 включает модификацию T366W («модификация выступа») (нумерация в соответствии с нумерацией EU) (т.е. модификации, изложенные в таблице 2). Дополнительно, обе цепи Fc дополнительно содержат модификации L234A, L235A и P329G, и, возможно, D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU). Возможно, первый домен СН3 дополнительно включает аминокислотную модификацию S354C, а второй домен СН3 дополнительно включает аминокислотную модификацию Y349C (нумерация в соответствии с нумерацией EU), таким образом, что образуется дисульфидная мостиковая связь между обоими доменами СН3.

В еще одном воплощении биспецифические антитела в соответствии с изобретением представляют собой трехвалентные биспецифические антитела, включающие один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и одну часть Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА. Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен СН1. Каждый Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем тяжелая цепь включает домен СН1, который включает аминокислотные модификации A141W, L145E, K147T и

Q175E (нумерация в соответствии с нумерацией EU), и причем легкая цепь включает соответствующий домен CL, который включает аминокислотные модификации F116A, Q124R, L135V и T178R (нумерация в соответствии с нумерацией Кабата) (т.е. модификации, изложенные в таблице 5). Часть Fc включает первую цепь Fc и вторую цепь Fc, причем первая цепь Fc включает первый константный домен CH2 и первый константный домен CH3, а вторая цепь Fc включает второй константный домен CH2 и второй константный домен CH3. Первый домен CH3 включает модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V, а второй домен CH3 включает модификации T350V, T366L, K392L и T394W (нумерация в соответствии с нумерацией EU) (т.е. модификации, изложенные в таблице 3). Дополнительно, обе цепи Fc дополнительно содержат модификации L234A, L235A и P329G, и, возможно, D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В некоторых воплощениях Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранную из группы:

а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:23, области CDR2L с SEQ ID NO:24 и области CDR3L с SEQ ID NO:20,

б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20,

в) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20,

г) области CDR1H с SEQ ID NO:29, области CDR2H с SEQ ID NO:30, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33,

д) области CDR1H с SEQ ID NO:34, области CDR2H с SEQ ID NO:35, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33,

е) области CDR1H с SEQ ID NO:36, области CDR2H с SEQ ID NO:37, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:31, области CDR2L с SEQ ID NO:32 и области CDR3L с SEQ ID NO:33,

ж) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18 и области CDR2L с SEQ ID NO:19, и области CDR3L с SEQ ID NO:20, и

Fab-фрагмент антитела против CD3 включает область CDR1H с SEQ ID NO:1, область CDR2H с SEQ ID NO:2, область CDR3H с SEQ ID NO:3, область CDR1L с SEQ ID NO:4, область CDR2L с SEQ ID NO:5 и область CDR3L с SEQ ID NO:6.

В некоторых воплощениях Fab-фрагмент антитела против BCMA включает VH и VL, выбранные из группы, состоящей из:

- а) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:12,
- б) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:13,
- в) области VH с SEQ ID NO:10 и области VL с SEQ ID NO:14,
- г) области VH с SEQ ID NO:38 и области VL с SEQ ID NO:12,
- д) области VH с SEQ ID NO:39 и области VL с SEQ ID NO:12,
- е) области VH с SEQ ID NO:40 и области VL с SEQ ID NO:12, или
- ж) области VH с SEQ ID NO:9 и области VL с SEQ ID NO:11; и

Fab-фрагмент антитела против CD3 включает область VH с SEQ ID NO:7 и область VL с SEQ ID NO:8.

В дополнительных воплощениях мультиспецифическое (например, биспецифическое антитело) в соответствии с изобретением включает следующие SEQ ID NO (упомянутые в таблицах 6A, 7B и 7C ниже):

83A10-TCB_{CV}: 45, 46, 47 (x2), 48 (фиг. 2A)

21-TCB_{CV}: 49, 50, 51 (x2), 48 (фиг. 2A)

22-TCB_{CV}: 52, 53, 54 (x2), 48 (фиг. 2A)

42-TCB_{CV}: 55, 56, 57 (x2), 48 (фиг. 2A)

Mab101: 58, 59, 60 (x2), 48 (фиг. 2A, но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»)

Mab102: 61, 62, 63 (x2), 48 (фиг. 2A, но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»)

Mab103: 64, 65, 66 (x2), 48 (фиг. 2A, но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»).

Используемый здесь термин «83A10-TCBcv» относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с BCMA и CD3 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 (2x) и SEQ ID NO:48, и как представлено на фиг. 2A и описано в EP14179705.

Используемые здесь термины «21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv» относятся к соответствующему биспецифическому антителу Mab21 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51 (2x), Mab22 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:54 (2x), и Mab42 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57-(2x), и как представлено на фиг. 2A и описано в WO 2017/021450.

Используемый здесь термин «Mab101» относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с BCMA и CD3 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60 (2x) и SEQ ID NO:59, и как представлено на фиг. 2A (но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»). Используемый здесь термин «Mab102» относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с BCMA и CD3 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63 (2x), и SEQ ID NO:62, и как представлено на фиг. 2A (но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой

цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»). Используемый здесь термин «Mab103» относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с ВСМА и CD3 в соответствии с комбинацией его тяжелой и легкой цепей в соответствии с SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 (2x) и SEQ ID NO:65, и как представлено на фиг. 2А (но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE»).

В предпочтительных воплощениях, биспецифическое антитело в соответствии с изобретением представляет собой 42-TCBcv. Используемый здесь термин «СС-93269» относится к биспецифическому антителу 42-TCBcv.

Антитела, обладающие улучшенной стабильностью

Здесь предложены мультиспецифические (например, биспецифические) антитела против ВСМА и Т-клеточного антигена (например, CD3), имеющие одну или более чем одну аминокислотную модификацию, которые обеспечивают улучшенную стабильность (например, улучшенные физико-химические свойства) по сравнению с антителами без этой(их) модификации(й). Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, векторы, клетки-хозяева и включающие их фармацевтические композиции, способы их получения и их применение, включая способы лечения.

В одном из аспектов в соответствии с изобретением предложено мультиспецифическое антитело, которое связывается с ВСМА и Т-клеточным антигеном, причем мультиспецифическое антитело включает (1) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент; (2) антитело против Т-клеточного антигена или его антигенсвязывающий фрагмент; и (3) Fc, причем антитело против ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента включает:

а) домен VH, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22, область CDR3H с SEQ ID NO:17, и домен VL, включающий область CDR1L с SEQ ID NO:27, область CDR2L с SEQ ID NO:28 и область CDR3L с SEQ ID NO:20;

б) домен VH, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:21, область CDR2H с SEQ ID NO:22, область CDR3H с SEQ ID NO:17, и домен VL, включающий область

CDR1L с SEQ ID NO:25, область CDR2L с SEQ ID NO:26 и область CDR3L с SEQ ID NO:20; или

в) домен VH, включающий область CDR1H с SEQ ID NO:15, область CDR2H с SEQ ID NO:16, область CDR3H с SEQ ID NO:17, и домен VL, включающий область CDR1L с SEQ ID NO:18, область CDR2L с SEQ ID NO:19 и область CDR3L с SEQ ID NO:20,

причем мультиспецифическое антитело включает домен CH1 и домен CL, причем домен CH1 включает аминокислотные модификации в позициях A141, L145, K147 и Q175 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), а домен CL включает аминокислотные модификации в позициях F116, Q124, L135 и T178 (нумерация в соответствии с Кабатом),

и причем Fc включает первую цепь Fc, включающую первые константные домены CH2 и CH3, и вторую цепь Fc, включающую вторые константные домены CH2 и CH3, причем первый домен CH3 включает аминокислотные модификации в позициях T350, L351, F405 и Y407 (нумерация в соответствии с нумерацией EU) и второй домен CH3 включает аминокислотные модификации в позициях T350, T366, K392 и T394 (нумерация в соответствии с нумерацией EU), возможно причем Т-клеточный антиген представляет собой CD3.

В некоторых воплощениях домен CH1 включает две или более чем две (например, все) из модификаций A141W, L145E, K147T и Q175E, или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU), и причем домен CL включает две или более чем две (например, все) из модификаций F116A, Q124R, L135V и T178R, или их консервативные замены (нумерация в соответствии с Кабатом).

Домен CH1 и домен CL, содержащие аминокислотные модификации, могут быть получены из антитела против ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента, или антитела против Т-клеточного антигена или его антигенсвязывающего фрагмента. В предпочтительных воплощениях антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включает домен CH1 и домен CL, включающие аминокислотные модификации.

В некоторых воплощениях первый домен CH3 включает одну или более чем одну из модификаций T350V, L351Y, F405A и Y407V или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и второй домен CH3 включает одну или

более чем одну из модификаций T350V, T366L, K392L и T394W или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU). В предпочтительных воплощениях первый домен СНЗ включает модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и второй домен СНЗ включает модификации T350V, T366L, K392L и T394W или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем домен VH антитела против CD3 включает CDR с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и домен VL антитела против CD3 включает CDR с SEQ ID NO: 4, 5 и 6 в виде, соответственно, легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В предпочтительных воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий VH с SEQ ID NO: 7, и VL с SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением включают IgG1 Fc, и причем возможно Fc включает:

- а) модификации L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с нумерацией EU); и/или
- б) модификации D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В воплощении мультиспецифическое антитело в соответствии с изобретением представляет собой биспецифическое трехвалентное антитело, включающее два Fab-фрагмента антитела против ВСМА и один Fab-фрагмент антитела против CD3, возможно причем антитело находится в формате Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА.

В аспекте изобретения предложено мультиспецифическое антитело, которое связывается с ВСМА и CD3, причем мультиспецифическое антитело находится в формате трехвалентного биспецифического антитела, причем мультиспецифическое антитело включает один Fab-фрагмент антитела против CD3, два Fab-фрагмента

антитела против ВСМА и один Fc в соответствии с форматом Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА, и причем:

а) Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1,

б) каждый Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь включает переменный домен VL и константный домен CL, и тяжелая цепь включает переменный домен VH и константный домен CH1, и причем:

(1) переменный домен VH включает CDR 1-3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 21, 22 и 17, соответственно, и переменный домен VL включает CDR 1-3 легкой цепи с SEQ ID NO: 27, 28 и 20, соответственно;

(2) переменный домен VH включает CDR тяжелой цепи 1-3 с SEQ ID NO: 21, 22 и 17, соответственно, и переменный домен VL включает CDR 1-3 легкой цепи с SEQ ID NO: 25, 26 и 20, соответственно; или

(3) переменный домен VH включает CDR 1-3 тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно, и переменный домен VL включает CDR 1-3 легкой цепи с SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно;

а) домен CH1 каждого Fab-фрагмента антитела против ВСМА включает модификации A141W, L145E, K147T и Q175E или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией EU), и соответствующий домен CL каждого Fab-фрагмента антитела против ВСМА включает модификации F116A, Q124R, L135V, T178R или их консервативные замены (нумерация в соответствии с нумерацией Кабата),

б) Fc включает первую цепь Fc и вторую цепь Fc, где первая цепь Fc включает первые константные домены CH2 и CH3, и вторая цепь Fc включает вторые константные домены CH2 и CH3, причем первая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом одного Fab-фрагмента антитела против ВСМА, а вторая цепь Fc связана по N-концу в Fc с C-концом Fab-фрагмента антитела против CD3, и причем:

(1) первый домен СНЗ включает модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V, а второй домен СНЗ включает модификации T350V, T366L, K392L и T394W (нумерация в соответствии с нумерацией EU), и

(2) обе цепи Fc включают модификации L234A, L235A и P329G, и возможно модификации D356E и L358M (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

В дополнительном аспекте изобретения предложено трехвалентное биспецифическое антитело, которое связывается с ВСМА и с CD3, причем трехвалентное биспецифическое антитело включает следующие SEQ ID NO:

1. Mab101: 58, 59, 48, и 2x 60.
2. Mab102: 61, 62, 48, и 2x 63.
3. Mab103: 64, 65, 48, и 2x 66.

Каждая молекула Mab101, Mab102 и Mab103 находится в биспецифическом формате 2+1, как представлено на фиг. 2А, но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-СН1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем проиллюстрированные замены «RK/EE».

В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, включающая мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый эксципиент. В связанном аспекте предложена фармацевтическая композиция, включающая трехвалентное биспецифическое антитело в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В еще одном аспекте мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением, трехвалентное биспецифическое антитело в соответствии с изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

В связанном аспекте предложен способ лечения субъекта, где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении, мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в соответствии с изобретением, трехвалентного биспецифического антитела в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

В предпочтительных воплощениях, мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело в соответствии с изобретением, трехвалентное биспецифическое антитело в соответствии с изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предназначена для применения в качестве лекарственного средства для лечения расстройства клеток плазмы крови. В некоторых воплощениях расстройство клеток плазмы крови представляет собой рак. В предпочтительных воплощениях рак представляет собой множественную миелому или плазмноклеточный лейкоз.

Фармацевтические композиции

Мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть введены субъекту в виде фармацевтической композиции. Соответственно, в настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, включающая мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» означает, что он одобрен регулирующим органом федерального или государственного управления или перечислен в фармакопее США, Европейской фармакопее или других общепризнанных фармакопеех для применения в отношении животных, и, конкретней, в отношении людей.

Раскрытые здесь фармацевтические композиции предназначены без ограничения для применения при диагностике, обнаружении или контроля за расстройством, при предупреждении, лечении, терапии или облегчения расстройства, или его одного или более чем одного симптома, и/или в исследованиях. Раскрытые здесь фармацевтические композиции могут быть подходящими для ветеринарных применений или фармацевтических применений у людей.

Примеры подходящих экспериментов включают одно или более чем одно из воды, физиологического раствора, физиологического раствора, забуференного фосфатом, декстрозы, глицерина, этанола и т.п, а также любую их комбинацию. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, полиспирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры подходящих эксципиентов включают: (1) физиологический раствор, дополненный фосфатом Дульбекко с рН, составляющим приблизительно 7,4, содержащий

приблизительно от 1 мг/мл до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, или не содержащий его, (2) 0,9% физиологический раствор (0,9% масс./об. хлорида натрия (NaCl)), и (3) 5% (масс./об.) декстрозы; и также могут содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Tween 20[®].

Специалисту в данной области техники понятно, что подходящий выбор эксципиента или эксципиентов для применения с мультиспецифическими (например, биспецифическими) антителами в соответствии с изобретением может зависеть от желаемых свойств фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции или мультиспецифические (например, биспецифические) антитела в соответствии с изобретением могут быть введены субъекту при помощи любого подходящего системного или локального пути введения. Например, введение может быть пероральным, трансбуккальным, подъязычным, офтальмологическим, интраназальным, внутритрахеальным, легочным, местным, трансдермальным, урогенитальным, ректальным, подкожным, внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутричерепным, внутриоболочечным, эпидуральным, внутрижелудочковым или внутриопухолевым. В некоторых воплощениях фармацевтические композиции или мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело вводят внутривенно или подкожно. В предпочтительных воплощениях, фармацевтические композиции или мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело вводят внутривенно.

Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут быть приготовлены для введения при помощи соответствующих способов, например, при помощи эпидермальных или трансдермальных пластырей, мазей, лосьонов, кремов или гелей; при помощи небулайзеров, испарителей или ингаляторов; путем инъекции или инфузии; или форме капсул, таблеток, жидких растворов или суспензий в воде или не водных средах, капель, суппозиториях, клизм, спреев или порошков. Наиболее подходящий путь для введения в любом конкретном случае зависит от физического и умственного состояния пациента, природы и тяжести заболевания, и желаемых свойств композиции.

Способы монотерапии и комбинированной терапии

В некоторых воплощениях лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в соответствии с изобретением субъекту в виде монотерапии.

В некоторых воплощениях лечение включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в соответствии с изобретением субъекту в виде комбинированной терапии, при котором комбинированная терапия включает введение мультиспецифического (например, биспецифического) антитела в соответствии с изобретением и одного или более чем одного дополнительного терапевтического агента. Предполагается, что термин «комбинированная терапия» охватывает введение выбранных терапевтических агентов одному пациенту, и, как предполагается, включает способы лечения, при которых агенты вводят при помощи одного и того же или отличающихся путей введения или одновременно или в различные моменты времени.

В некоторых воплощениях один или более чем один дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из антифолата (например, метотрексата), ингибитора пуринового синтеза (например, азатиоприна, микофенолата и/или микофенолата мофетила), ингибитора C5a (например, авакопана), антитела против CD19, антитела против CD20 (например, ритуксимаба), стероида, ингибитора тирозинкиназы Брутона (ВТК) и/или антагониста BAFF/APRIL (например, антитела против BAFF).

Авторы настоящего изобретения идентифицировали то, что существует минимальная потребность в стероидах для того, чтобы вызывать ремиссию и/или поддерживать ремиссию. Таким образом, в некоторых воплощениях один или более чем один дополнительный терапевтический агент не представляет собой стероид, например, глюкокортикоид.

В некоторых воплощениях один или более чем один дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, антитела против CD38, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, ингибитора гамма-секретазы (GSI), антитела против BCMA, нагруженного лекарственным средством и CAR T-клеточной терапии против BCMA.

Используемый здесь термин «антитело против CD38» относится к антителу, специфически связывающемуся с человеческим CD38. В воплощении в соответствии с

изобретением антитело против CD38 представляет собой даратумумаб (US20150246123). В воплощении изобретения антитело против CD38 представляет собой изатуксимаб (SAR650984, US8877899). В воплощении изобретения антитело против CD38 представляет собой MOR202 (WO 2012041800). В воплощении изобретения антитело против CD38 представляет собой Ab79 (US8362211). В воплощении изобретения антитело против CD38 представляет собой Ab19 (US8362211). Дозировку такого антитела против CD38 осуществляют в соответствии с уровнем техники, и она описана в соответствующих указаниях по применению. Например, доза даратумумаба обычно составляет 16 мг/кг (www.ema.europa.eu).

Используемый здесь термин «соединение талидомида» или «талидомид и иммунотерапевтическое производное» относится к 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диону и его иммунотерапевтическим производным. В воплощении изобретения соединение талидомида выбрано из группы, состоящей без ограничения из талидомида (номер в соответствии с CAS (реферативный журнал “Chemical Abstracts”) 50-35-1), леналидомида (номер в соответствии с CAS 191732-72-6), помалидомида (номер в соответствии с CAS 19171-19-8), CC122 (номер в соответствии с CAS 1398053-45-6) и CC-220 (номер в соответствии с CAS 1323403-33-3) и соответствующих солей (предпочтительно солей HCl 1:1). Химическая формула CC-122 представляет собой 2,6-пиперидиндион,3-(5-амино-2-метил-4-оксо-3(4H-хиназолинил), хлоргидрат (1:1) и для CC-220 она представляет собой 2,6-пиперидиндион, 3-[1,3-дигидро-4-[[4-(4-морфолинилметил)фенил]метокси]-1-оксо-2H-изоиндол-2-ил]-, (3S)-, хлоргидрат (1:1). Способы получения CC-220 описаны, например, в US 20110196150, на который здесь ссылаются.

Дозирование талидомидных соединений осуществляют в соответствии с уровнем техники, и оно описано в соответствующих указаниях по применению. Например, доза Revlimid® (леналидомида) обычно составляет 25 мг один раз в сутки перорально на 1-21 сутки повторяющихся 28-суточных циклов (www.revlimid.com), а доза POMALYST® (помалидомида) для лечения множественной миеломы обычно составляет 4 мг в сутки, принимаемые перорально на 1-21 сутки повторяющихся 28-суточных циклов (www.celgene.com). В одном из воплощений 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион вводят в количестве, составляющем от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг в сутки.

В одном из воплощений СС-122 и СС-220 вводят в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг в сутки. В еще одном воплощении СС-122 и СС-220 вводят в количестве приблизительно 5, 10, 15, 25, 30 или 50 мг в сутки. В еще одном воплощении в сутки вводят 10 или 25 мг СС-122 и СС-220. В одном из воплощений СС-122 и СС-220 вводят дважды в сутки.

Используемый здесь термин «антитело против PD-1» относится к антителу, специфически связывающемуся с человеческим PD-1. Такие антитела, например, описаны в WO2015026634 (МК-3475, пембролизумаб), US7521051, US8008449 и US8354509. Пембролизумаб (Keytruda[®], МК-3475) также описан в WO 2009/114335, Poole, R.M. Drugs (2014) 74: 1973; Seiwert, T., et al., J. Clin. Oncol. 32,5s (suppl;abstr 6011). В воплощении в соответствии с изобретением антитело PD-1 представляет собой МК-3475 (WHO Drug Information, Vol. 27, No. 2, pages 161-162 (2013)) и включает аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, представленные на Фиг. 6 в WO 2015026634. Аминокислотная последовательность пембролизумаба описана в WO2008156712 (CDR легкой цепь в соответствии с SEQ ID NO:15, 16 и 17 и CDR тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 18, 19 и 20). В воплощении в соответствии с изобретением антитело PD-1 представляет собой ниволумаб (BMS-936558, MDX 1106; WHO Drug Information, Vol. 27, No. 1, pages 68-69 (2013), WO2006/121168 аминокислотные последовательности представлены в WO 2015026634). В воплощении в соответствии с изобретением антитело PD-1 представляет собой пидилизумаб (CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1; в отношении аминокислотной последовательности смотри WO2003/099196; WO 2009/101611, Fried I. et al.; Neuro Oncol (2014) 16 (suppl 5): v111-v112.). В воплощении в соответствии с изобретением антитело PD-1 представляет собой MEDI-0680 (AMP-514, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, Hamid O. et al.; J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr TPS3087). В воплощении изобретения антитело PD-1 представляет собой PDR001 (Naing A. et al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3060). В воплощении изобретения антитело PD-1 представляет собой REGN2810 (Papadopoulos KPet al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3024). В воплощении изобретения антитело PD-1 представляет собой ламбролизумаб (WO2008/156712). В воплощении изобретения антитело PD-1 представляет собой h409A1, h409A16 или h409A17, которое описано в WO2008/156712. Дозировка такого антитела против PD-1 осуществляется в соответствии с уровнем техники и описана в

соответствующих указаниях по применению. Например, Keytruda[®] вводят обычно в концентрации 2 мг/кг массы тела один раз в три недели (<http://ec.europa.eu/health/documents>).

Используемый здесь термин «антитело против PD-L1» относится к антителу, специфически связывающемуся с человеческим PD-L1. Такие антитела, например, описаны в WO2015026634, WO2013/019906, WO2010/077634 и US8383796. В воплощении изобретения антитело против PD-L1 представляет собой MPDL3280A (атезолизумаб, YW243.55.S70, WO2010/077634, McDermott DF. Et al., JCO March 10, 2016 vol. 34 no. 8 833-842). В воплощении изобретения антитело против PD-L1 представляет собой MDX-1105 (BMS-936559, WO2007/005874, Patrick A. Ott PA et al., DOI: 10.1158/1078-0432, Clinical Cancer Research-13-0143). В воплощении изобретения антитело против PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб, WO 2016/040238 Gilbert J. et al., Journal for ImmunoTherapy of Cancer 20153(Suppl 2):P152). В воплощении изобретения антитело против PD-L1 представляет собой MSB001071 8C (авелумаб, Disis ML. et al., Journal of Clinical Oncology, Vol 33, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 5509). В воплощении изобретения антитело против PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1, включающее последовательность VH с SEQ ID NO: 16 и последовательность VL с SEQ ID NO: 17, как описано в WO2016007235. Дозирование такого антитела против PD-L1 осуществляется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих указаниях по применению. Например, атезолизумаб вводят обычно в концентрации 1200 мг в виде внутривенной инфузии в течение 60 минут один раз в 3 недели (www.accessdata.fda.gov).

Используемый здесь термин «гамма-секретаза» относится к любому белку или белковому комплексу, который демонстрирует активности гамма-секретазы, включающие связывание с субстратом, имеющим последовательность, расщепляемую гамма-секретазой, и катализ расщепления последовательности, расщепляемой гамма-секретазой, по сайту расщепления гамма-секретазой с получением продуктов расщепления субстрата. В одном из воплощений гамма-секретаза представляет собой белковый комплекс, включающий один или более чем один из следующих субъединиц: пресенилин, никастрин, субъединицу гамма-секретазы APH-1 и субъединицу гамма-секретазы PEN-2.

Используемый здесь термин «ингибитор гамма-секретазы» или «GSI» относится к любой молекуле, способной ингибировать или уменьшать экспрессию и/или функцию гамма-секретазы. В некоторых воплощениях GSI уменьшает экспрессию и/или функцию субъединицы гамма-секретазы (например, пресенилин, никастрин, АРН-1 или РЕН-2). В этот термин включена любая форма «ингибитора гамма-секретазы», такая как соль, сокристалл, кристаллическая форма, пролекарство и т.д. В некоторых воплощениях GSI выбран из антитела или антигенсвязывающего фрагмента, небольшой молекулы, белка или пептида, и нуклеиновой кислоты.

Неблагоприятные действия

В некоторых воплощениях у пациента развивается или имеется риск развития неблагоприятного явления, связанного с введением мультиспецифического (например, биспецифического) антитела. Неблагоприятное явление может представлять собой токсичности, стимулируемые цитокинами (например, синдром высвобождения цитокинов (CRS)), реакции, связанные с инфузией (IRR), инфекцию, синдром активации макрофагов (MAS), неврологические токсичности, тяжелый синдром лизиса опухоли (TLS), нейтропению, тромбоцитопению, повышенные печеночные ферменты и/или токсичности в отношении центральной нервной системы (CNS). В конкретных воплощениях неблагоприятное явление представляет собой CRS.

В случае, когда у пациента развивается или имеется риск развития неблагоприятного явления, связанного с введением мультиспецифического (например, биспецифического) антитела, лечение дополнительно может включать введение агента, способного лечить, предупреждать, замедлять, уменьшать или ослаблять развитие или риск развития неблагоприятного явления. Агент может быть введен пациенту перед началом лечения мультиспецифическим (например, биспецифическим) антителом (например, в качестве профилактики для предупреждения или уменьшения риска развития неблагоприятного явления) или во время лечения мультиспецифическим (например, биспецифическим) антителом (например, в ответ на развитие неблагоприятного явления).

В некоторых воплощениях агент включает стероид, такой как кортикостероид. Используемый здесь «кортикостероид» обозначает любой природный или синтетический стероидный гормон, который может быть получен из холестерина, и характеризуется гидрогенизированной циклопентанопергидрофенантроновой кольцевой

системой. Встречающиеся в природе кортикостероиды в общем продуцируются корой надпочечников. Синтетические кортикостероиды могут быть галогенированными. Функциональные группы, требующиеся для активности, включают двойную связь по Δ^4 , C3 кетон и C20 кетон. Кортикостероиды могут обладать глюкокортикоидной и/или минералокортикоидной активностью. Примеры кортикостероидов включают преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, триамцинолон, бетаметазон, будезонид и дексаметазон.

В некоторых воплощениях агент включает антагонист цитокинового рецептора или цитокин, выбранный из GM-CSF (колониестимулирующего фактора гранулоцитов/макрофагов), IL-10, IL-10R, IL-6, рецептора IL-6 (IL-6R), IFN γ , IFNGR (рецептора IFN γ), IL-2, IL-2R/CD25, MCP-1, CCR2, CCR4, MIP1 β , CCR5, TNF-альфа, TNFR1, IL-1, и IL-1R альфа/IL-1 бета, причем антагонист выбран из антитела или антигенсвязывающего фрагмента, небольшой молекулы, белка или пептида и нуклеиновой кислоты. Антагонист может представлять собой антитело против IL-6 и/или антитело против IL6R. Например, антагонист может быть выбран из тоцилизумаба, силтуксимаба, клазакизумаба, сарилумаба, олокизумаба, элсилимомаба, ALD518/BMS-945429, сирукумаба (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, лензилумаба, FE301 и FM101. В некоторых воплощениях антагонист представляет собой тоцилизумаб и/или силтуксимаб.

В некоторых воплощениях агент включает молекулу, которая уменьшает популяцию регуляторных Т-клеток (Treg). Агенты, которые уменьшают количество (например, истощают количество) клеток Treg, известны в области техники и включают, например, истощение по CD25, введение циклофосфида, антитело против CTLA4 и модулирование вызванной глюкокортикоидами функции гена, связанной с семейством TNLR (GITR). GITR представляет собой член суперсемейства TNLR, который подвергается повышающей регуляции на активированных Т-клетках, которые усиливают иммунную систему. В некоторых воплощениях лечение включает введение циклофосфида.

Как указывалось выше, авторы настоящего изобретения не обнаружили значительного высвобождения цитокинов или минимальное высвобождение цитокинов после лечения биспецифическими антителами в соответствии с изобретением. Соответственно, в некоторых воплощениях, в которых неблагоприятное явление

представляет собой токсичность, стимулируемую цитокинами (например, CRS), лечение не включает дополнительно введение агента, способного лечить, предупреждать, замедлять, уменьшать или ослаблять развитие или риск развития неблагоприятного явления, такого как антагонист цитокинового рецептора или цитокин.

Ограничение изобретения

Вышеприведенные воплощения следует рассматривать как иллюстративные примеры. Рассматриваются дополнительные воплощения. Понятно, что любое свойство, описанное в отношении любого из воплощений, может быть использовано само по себе или в комбинации с другими описанными свойствами, также может быть использовано в комбинации с одним или более чем одним свойством любого другого из воплощений или любой комбинацией любых других воплощений. Кроме того, эквиваленты и модификации, не описанные выше, также могут быть использованы без того, чтобы выйти из объема изобретения, который определяется формулой изобретения.

В контексте настоящего изобретения другие примеры и вариации описанных здесь антител и способов будут понятны специалисту в данной области техники. Другие примеры и вариации находятся в объеме изобретения, изложенного в формуле изобретения.

Каждый из цитированных здесь документов полностью включен путем ссылки, включая все данные, таблицы, графические материалы и текст, представленные в цитированных документах.

Таблица 6А: Последовательности антитела

SEQ NO:	ID	Название(я)	Аминокислотная последовательность
1		CD3 CDR1H	TYAMN
2		CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3		CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4		CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5		CD3 CDR2L	GTNKRAP

6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
7	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEI K
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAW YQQKPGQAPRLLIEHA STRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEI K
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDF

		TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI K
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSW YQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLAISRLPEDEFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI K
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFDY
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLA
19	83A10 CDR2L	GASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPDF
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H	DNAMG

	Mab42 CDR1H	
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLA
26	Mab22 CDR2L	GAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLS
28	Mab42 CDR2L	SASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT

34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAPMG WVRQAPGKGLEWVSAISYIGHTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF YWGQGTLVTVSS
39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMG WVRQAPGKGLEWVSAINRFGGSTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISPTGFSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS

	Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
45	83A10 knob HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

46	83A10 hole HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
47	83A10 LC	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>
48	CD3 LC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
49	Mab21 knob HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF</p>

		<p>DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
50	Mab21 hole HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

51	Mab21 LC	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAW YQQKPGQAPRLIEHA STRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNDFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>
52	Mab22 knob HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
53	Mab22 hole HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</p>

		<p>AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
54	Mab22 LC	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAW YQQKPGQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>
55	Mab42 knob HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</p>

		YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
56	Mab42 hole HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSW YQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLAISRLPEDEFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
58	Mab101 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV

		<p>LESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGSFALVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
59	Mab101 HC-2	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLLC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG</p>
60	Mab101 LC	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI</p>

		<p>KRTVAAPSVAIFPPSDERLKSGTASVVCVLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>
61	Mab102 HC-1	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDFALVSKLTVDKSRW QQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
62	Mab102 HC-2	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</p>

		DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKLSLSPG
63	Mab102 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAW YQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVAIFPPSDERLKSGTASVVCVLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL SRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
64	Mab103 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPG
65	Mab103 HC-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMG WVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

		<p>AWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQA VVTQEPLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG</p>
66	Mab103 LC	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSW YQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLAISRLPEPDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVVAIFPPSDERLKSGTASVVCVLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SRLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>
67	83A10 CDR1L (альтернатива SEQ ID NO: 18)	RASQSVSSSYLAW
68	83A10 CDR2L (альтернатива SEQ ID NO: 19)	YGASSRAT

69	Mab22 CDR1L (альтернатива SEQ ID NO: 25)	RASQSVSSYYLAW
70	Mab22 CDR2L (альтернатива SEQ ID NO: 26)	SGAGSRAT
71	Mab42 CDR1L (альтернатива SEQ ID NO: 27)	RASQSVSDEYLSW
72	Mab42 CDR2L (альтернатива SEQ ID NO: 28)	HSASTRAT

Замечание: SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:33 идентичны

Таблица 6В: Последовательности антитела (короткий список)

	SEQ ID NO:							
Антитело против CD3	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
	7	8	1	2	3	4	5	6
антитело против BCMA	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33

Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33
-------	----	----	----	----	----	----	----	----

Таблица 7А: Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:			
Фрагмент/конструкция	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

Таблица 7В: Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:			
Конструкция	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc выступ LALA PG (выступ HC)	45	49	52	55
BCMAcv HC впадина LALA PG (hole HC)	46	50	53	56
BCMAcv чел IgG1 LC (BCMAcv LC)	47	51	54	57
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

Таблица 7С: Дополнительные конструкции

	SEQ ID NO:		
Конструкция	Mab101	Mab102	Mab103
BCMA VH-CH1zw Fc_zwA (HC-1)	58	61	64
BCMA VH-CH1zw x CD3 VL-CH1 Fc_zwB (HC-2)	59	62	65
BCMAzw чел IgG1 LC (BCMA LC)	60	63	66
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Поверхностная экспрессия BCMA на плазмаблестах и плазматических клетках и уровни растворимого BCMA в образцах от нормальных здоровых добровольцев (NHV) и пациентов, страдающих от AAV

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови, отобранной у четырех нормальных здоровых добровольцев (NHV) с

использованием градиента фикола. Экспрессию ВСМА определяли на плазмабластах (PB) путем проточной цитометрии. Плазмабласты идентифицировали как CD19(+) CD20(-) CD27(+) CD38(+). Покрытые антителом против ВСМА флуоресцентные частицы использовали для построения стандартных кривых для сравнения средней интенсивности флуоресценции с плотностью поверхностного рецептора ВСМА. Экспрессирующие ВСМА линии раковых клеток (JEKO, RPMI-8226 и H929) профилировали для сравнения (фиг. 4А). Поверхностная экспрессия ВСМА была гораздо ниже на плазмабластах, полученных у NHV, чем на линиях клеток множественной миеломы RPMI-8226 и H929, для всех тестируемых NHV.

Уровни растворимого ВСМА оценивали при помощи ELISA в образцах сыворотки или плазмы крови, отобранных у NHV («нормальные»), пациентов, страдающих от множественной миеломы («ММ») или васкулита, ассоциированного с ANCA («AAV») (Фиг. 4В). Уровни растворимого ВСМА были гораздо ниже в образцах NHV, чем в образцах ММ, отражая более низкие уровни экспрессии ВСМА на поверхности плазмабластов у NHV по сравнению с пациентами ММ. Уровни растворимого ВСМА в образцах сыворотки и плазмы крови (PR3+) в образцах AAV были сравнимы с образцами NHV, и были гораздо ниже чем в образцах ММ. В свете этой корреляции ожидается, что поверхностная экспрессия ВСМА на плазмабластах и плазматических клетках в образцах AAV сравнима с поверхностной экспрессией в образцах NHV.

Пример 2: Образование Т-клеточных биспецифических антител

Получали биспецифические антитела против ВСМА и против CD3, имеющие формат 1^й Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 – 2^й Fab-фрагмент антитела против ВСМА (называемый здесь как формат «2+1»). Способы получения биспецифических антител против ВСМА и против CD3 можно найти в WO2017/021450, включенном здесь путем ссылки.

HD1 обозначает, что:

- домен CH3 в Fc включает одну цепь с аминокислотной заменой T366W и одну цепь с аминокислотными заменами T366S, L368A и Y407V (как изложено в таблице 2); и
- оба Fab антител против ВСМА включают аминокислотные замены K147E и K213E в домене CH1 и аминокислотные замены E123R и Q124K в домене CL

(как изложено в таблице 4);

HD2 обозначает, что:

- домены CH2-CH3 в Fc включают одну цепь с аминокислотными заменами T350V, L351Y, F405A, Y407V и одну цепь с аминокислотными заменами T350V, T366L, K392L, T394W (как изложено в таблице 3);

- оба Fab-фрагмента антител против BCMA включают аминокислотные замены A141W, L145E, K147T, Q175E в домене CH1 и аминокислотные замены F116A, Q124R, L135V, T178R в домене CL (как изложено в таблице 5)

(нумерация аминокислотных позиций константной области тяжелой цепи в соответствии с нумерацией EU; нумерация аминокислотных позиций константной области легкой цепи в соответствии с Кабатом).

Дополнительно к вышеприведенным модификациям, приведенным для HD1 и HD2, Fc биспецифических антител в представленных примерах содержит аминокислотные замены R329G, L234A и L235A (нумерация позиций в соответствии с нумерацией EU).

Биспецифические антитела в представленных примерах также включают технологию «CrossMAb», в которой VH и VL Fab-фрагмента антитела против CD3 заменены.

Обобщающая информация для антител, полученных в представленных примерах, приведена в таблице 8.

Таблица 8: Биспецифические антитела против BCMA и против CD3, полученные в представленных примерах.

Название биспецифического антитела	Структура
CC-93269	2+1 (BCMA SEQ ID NO: 10+14)(CD3 SEQ ID NO: 7+8)HD1
Mab101	2+1 (BCMA SEQ ID NO: 9+11)(CD3 SEQ ID NO: 7+8)HD2
Mab102	2+1 (BCMA SEQ ID NO: 10+13)(CD3 SEQ ID NO: 7+8)HD2

Пример 3: Зависимое от дозы ВСМА привлекающее Т-клетки уничтожение клеток, экспрессирующих ВСМА, возникает с Т-клеточной активацией

Клетки JEKO

Клетки JEKO выращивали с CD3⁺ Т-клетками (оставляли на ночь) в отношении мишень:эффектор 1:2 (Т:Е) и с различными концентрациями биспецифических антител против ВСМА и против CD3 (ВСМА привлекающие Т-клетки активаторы). Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток JEKO оценивали по экспрессии аннексина V, измеряемой в течение 24 часов, причем изображения регистрировали каждые два часа. Подсчеты клеток V⁺ осуществляли с использованием программного обеспечения Incucyte ZOOM. Данные и значения EC₅₀, рассчитанные для 20-часового момента времени, представлены на Фиг. 5А и в Таблице 9.

Таблица 9: EC₅₀ для уничтожения клеток JEKO посредством ВСМА привлекающих Т-клетки активаторов

	Mab101	CC-93269	Mab102
EC ₅₀ для уничтожения клеток JEKO (нМ)	5,724	2,791	0,1196

Эти данные демонстрируют то, что ВСМА привлекающие Т-клетки активаторы (ВСМА ТСЕ) способны уничтожать клетки, экспрессирующие ВСМА, с уровнями, сравнимыми с уровнями для плазмабластов нормальных здоровых добровольцев.

Т-клеточную активацию анализировали путем проточной цитометрии для 24-часового интервала времени. Клетки отмывали и затем окрашивали в отношении маркеров линии Т-клеток (CD3, CD4 и CD8) и маркеров активации (CD69, CD25, и CD154). Образцы для проточной цитометрии измеряли при помощи BD LSRFortessa и анализировали с использованием программного обеспечения Treestar FlowJo X. Визуализацию клеток осуществляли при помощи Incucyte Live Cell Analysis Imaging System. Данные откладывали на диаграмме и величины EC₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 7.

Фиг. 5В демонстрирует Т-клеточную активацию, представленную путем экспрессии CD69 на CD8⁺ Т-клетках.

Эти данные демонстрируют увеличение частоты активированных Т-клеток при средней эффективной концентрации (EC_{50}) ВСМА привлекающего Т-клетки активатора уничтожения клеток JEKO.

Клетки MM

Линию клеток множественной миеломы RPMI-8226 выращивали вместе с NHV PBMC при различных отношениях мишень:эффектор (Т:Е) и различных концентрациях СС-93269. Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток RPMI-8226 оценивали путем экспрессии аннексина V, измеряемой в течение 96 часов, причем изображения регистрировали каждый час. Подсчеты аннексин V+ клеток осуществляли с использованием программного обеспечения Incucyte ZOOM; 25-часовой и 72-часовой моменты времени представлены на Фиг. 6А.

Т-клеточную активацию анализировали путем проточной цитометрии для 25-часового и 72-часового моментов времени. Через 25 часов клетки отмывали и затем окрашивали в отношении CD8 Т-клеточной линии и экспрессии CD69 в качестве маркера Т-клеточной активации (Фиг. 6В).

Эти данные демонстрируют то, что значительная Т-клеточная активация происходит в дозах СС-93269, равных или меньше чем дозы для уничтожения клеток MM.

Пример 4: Зависимое от дозы ВСМА привлекающее Т-клетки уничтожение плазмбластов здоровых добровольцев осуществляется при минимальной Т-клеточной активации

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови, отобранных у здоровых добровольцев с использованием градиента фикола, ресуспендированных в RPMI + 10% HI FBS. PBMC обрабатывали различными концентрациями ВСМА TCE или контрольным антителом 2+1 против HEL против CD3. После инкубации в течение 24 часов оценивали уничтожение плазмбластов, Т-клеточную активацию и продукцию цитокинов.

Уничтожение плазмбластов оценивали при помощи FACS, при помощи которого плазмбласты идентифицировали как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+), и привели в виде процентной доли от всех клеток CD19(+), нормализованной к не обработанному контролю. Подтвердили то, что клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+) обладали дополнительными известными маркерами плазмбластов: ВСМА(+) SLAMF7(+) IgD(-)

CD38(+) CD138(-). Фиг. 7А представляет собой типичную кривую зависимости от дозы, а фиг. 7В представляет собой типичную диаграмму FACS, гейтированную на клетках CD3(-) CD19(+). 50% Эффективная концентрация (EC₅₀) СС-93269 для уничтожения плазмбластов у здоровых добровольцев (n=12) составляет 0,005 нМ. Уничтожение плазмбластов происходит в концентрациях ВСМА ТСЕ меньше чем необходимые для уничтожения экспрессирующих ВСМА линий раковых клеток (например, клеток JEKO).

Для Т-клеточной активации клетки отмывали и затем окрашивали в отношении линии Т-клеток (CD3, CD4 и CD8) и активации маркеров (CD69, CD25 и CD154). Данные, представленные на фиг. 7С, представляют собой экспрессию CD69 на CD8(+) Т-клетках. Культуральные супернатанты анализировали в отношении продукции цитокинов (IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, гранзим В и перфорин) с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I (Фиг. 7D, Фиг. 8). Данные на Фиг. 8 представлены для СС-93269.

Вместе эти данные демонстрируют минимальное увеличение частоты активированных Т-клеток (т.е. меньше чем 20% выше базового уровня) и минимальную продукцию цитокинов (т.е. меньше чем 20 пг/мл выше базового уровня) при средней эффективной концентрации (EC₅₀) ВСМА ТСЕ в отношении уничтожения плазмбластов из РВМС здоровых добровольцев.

В таблице 10 обобщены данные для СС-93269 и проиллюстрировано минимальное увеличение частоты активированных Т-клеток при 90% эффективной концентрации (EC₉₀) для истощения плазмбластов. Для СС-93269 продемонстрировано глубокое истощение плазмбластов (более 90%) в РВМС здоровых добровольцев *in vitro*, при отсутствии значительной Т-клеточной активации.

Таблица 10: Уничтожение плазмбластов и Т-клеточная активация в РВМС здоровых добровольцев при помощи СС-93269

	Истощение плазмбластов		CD69+ CD8+ Т-клетки при:	
	EC ₉₀ (нМ)	EC ₉₉ (нМ)	EC ₉₀ истощения РВ	EC ₉₉ истощения РВ
СС-93269 (n=11)	0,054	0,594	Базовый уровень	Умеренный

				($< 5\% \text{ CD8}^+$ клеток)
--	--	--	--	---------------------------------

Пример 5: Действие в отношении других популяций В-клеток в РВМС здоровых добровольцев после выращивания с СС-93269

Обработанные СС-93269 образцы РВМС из примера 4 окрашивали в отношении маркеров линии В-клеток (CD20, CD27 и IgD). В-клетки памяти идентифицировали как клетки, демонстрирующие маркеры CD19 (+) CD20 (+) CD27 (+), и затем дополнительно подтверждали маркерами IgD (-) CD38 (-) ВСМА (+/-). Данные представлены на Фиг. 9А-С, которые представлены в виде процентной доли от всех клеток CD19(+) CD20(+). Эти данные демонстрируют то, что СС-93269 не приводят к значительному истощению популяций наивных, некоммитированных или коммитированных В-клеток памяти среди РВМС здоровых добровольцев *in vitro* при 90% эффективной концентрации (EC90) в отношении уничтожения плазмбластов.

Пример 6: Зависимое от дозы опосредованное ВСМА ТСЕ уничтожение плазмбластов при манипуляциях с костным мозгом при минимальной Т-клеточной активации

Мононуклеарные клетки костного мозга (ВМ) выделяли из костного мозга здоровых добровольцев с использованием градиента фиколла и затем обрабатывали различными концентрациями ВСМА ТСЕ или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3. После инкубации в течение 24 часов уничтожение плазмбластов (Фиг. 10А, таблица 11) и Т-клеточную активацию (Фиг. 10В) оценивали путем проточной цитометрии, как в примере 4. РВМС, выделенные у здоровых добровольцев, суспендировали в средах или супернатанте костного мозга (ВМ) и затем обрабатывали ВСМА ТСЕ или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3 в течение 24 часов для сравнения.

Таблица 11: Уничтожение плазмбластов в мононуклеарных клетках костного мозга при помощи ВСМА ТСЕ

	Mab101	СС-93269	Mab102
EC ₅₀ для уничтожения плазмбластов ВМ (нМ)	0,2662	0,02012	0,002807

Эти данные демонстрируют то, что ВСМА ТСЕ вызывают уничтожение плазмбластов костного мозга в концентрациях, похожих на плазмбласты из РВМС,

супспендированные в средах, и при минимальной Т-клеточной активации. Эти данные являются значимыми, поскольку долгоживущие плазмбласты и плазматические клетки предпочтительно обнаруживаются в костном мозге.

Пример 7: Зависимое от дозы опосредованное ВСМА ТСЕ уничтожение плазмбластов при ААV при минимальной Т-клеточной активации

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из цельной крови, отобранной у пациентов, страдающих от ААV, включая рецидивирующий ААV или ААV, устойчивый к лечению ритуксимабом, метотрексатом и фолиевой кислотой, с использованием градиента фиколла, и затем обрабатывали различными концентрациями ВСМА ТСЕ (СС-93269, Mab101 или Mab102) или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3. После инкубации в течение 24 часов оценивали уничтожение плазмбластов (Фиг. 11А-11В), Т-клеточную активацию (Фиг. 11С, 12А-12С) и продукцию цитокинов (Фиг. 11D).

Уничтожение плазмбластов оценивают при помощи FACS, при помощи которого плазмбласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+), и они приведены в виде процентной доли от всех клеток CD19(+), нормализованной к не обработанному контролю (Фиг. 11А). Подтверждали, что клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+) обладают дополнительными известными маркерами плазмбластов: ВСМА(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-). Фиг. 11В представляет собой типичную диаграмму FACS, гейтированную на клетках CD3(-) CD19(+). 50% Эффективная концентрация (EC₅₀) СС-93269 для уничтожения плазмбластов при ААV составляет 0,007 нМ. Уничтожение плазмбластов при ААV осуществляется в концентрациях ВСМА ТСЕ, меньших чем те, которые необходимы для уничтожения линий раковых клеток JEKO несмотря на похожие уровни экспрессии ВСМА.

Для Т-клеточной активации клетки отмывали и затем окрашивали в отношении линии Т-клеток (CD3, CD4 и CD8) и активации маркеров (CD69, CD25 и CD154). Данные, представленные на Фиг. 11С, представляют собой экспрессию CD69 на CD8(+) Т-клетках. Данные, представленные на Фиг. 12А-С, представляют собой уровни экспрессии CD69 или CD25 на CD4(+) Т-клетках или CD8(+) Т-клетках.

Культуральные супернатанты анализировали в отношении продукции цитокинов (IFN γ , IL-6, TNF α , IL-1 β , гранзим А, гранзим В и перфорин) с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I. Данные для IFN γ представлены на Фиг. 11D.

Вместе эти данные не демонстрируют ни значительного увеличения частоты активированных Т-клеток (т.е. меньше чем 20% выше базового уровня), ни продукции цитокинов (т.е. меньше чем 20 пг/мл выше базового уровня), в дозах ВСМА ТСЕ, достаточных для уничтожения плазмабластов при ААV.

В таблице 12 обобщены данные для примеров 4 и 7, акцентирующие внимание на окно концентрации ВСМА ТСЕ для уничтожения плазмабластов (PB) без Т-клеточной активации. В этом окне неблагоприятные явления, связанные с активацией Т-клеток или избыточной продукцией цитокинов, такой как синдром высвобождения цитокинов (CRS), возникают в меньшей степени.

Таблица 12: Терапевтическое окно для ВСМА ТСЕ для достижения уничтожения плазмабластов (PB) без Т-клеточной активации

Обработка ТСЕ	Донор	EC ₅₀ для уничтожения PB (нМ)	EC ₅₀ для Т-клеточной активации (нМ)		Окно между уничтожением и Т-клеточной активацией
			CD8, CD69+ (нМ)	Секреция IFN γ (нМ)	
Mab101 (Kd ВСМА =1,1 нМ)	Здоровые добровольцы (n=2)	0,257 +/- 0,087	>1	>1	≥ 3
	AAV-1 (n=1)	0,236	>1	>1	≥ 4
CC-93269 (Kd ВСМА =0,14 нМ)	Здоровые добровольцы (n=6)	0,029 +/- 0,029	$\geq 0,68$ +/- 0,04	$\geq 0,92$ +/- 0,12	16-22
	AAV-1 (n=1)	0,010	>1	>1	> 100
Mab102	Здоровые добровольцы (n=3)	0,007 +/- 0,006	0,63 +/- 0,61	0,91 +/- 1,1	90 - >100

(Kd BCMA =0,06 нМ)	AAV-1 (n=1)	0,003	0,77	>1	> 100
--------------------	-------------	-------	------	----	-------

Пример 8: Зависимое от дозы опосредованное СС-93269 уничтожение плазмаблатов пациента, страдающего от AAV, которого лечили ритуксимабом

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) при помощи градиента фиколла выделяли из цельной крови пациента, страдающего от AAV, AAV-5, который до этого в течение 5 месяцев получал ритуксимаб, и ресуспендировали в RPMI +10% HI FBS. PBMC обрабатывали увеличивающимися концентрациями СС-93269 (Фиг. 13В-13С) или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3 (Фиг. 13А) в течение 24 часов, затем оценивали путем проточной цитометрии. Клетки гейтировали в отношении жизнеспособности и синглетов для получения диаграмм FACS живых клеток (Фиг. 13). Плазмабласты определяют как CD19+ CD27+ CD20-. Также подтверждали то, что плазмабласты представляли собой CD38+, BCMA+ и CD138- (данные не представлены). В результате гейтирования CD19+ CD20+ наивные В-клетки определяли как CD27- IgD+, некоммутированные В-клетки памяти как CD27+ IgD+ и коммутированные В-клетки памяти как CD27+ и IgD-. Представлены типичные точечные диаграммы для нормального здорового добровольца. Утрата CD20 (+) В-клеток, но высокий подсчет CD20(-) CD27(+) плазмабластов обнаружен в контроле (Фиг. 13А), демонстрируя то, что ритуксимаб приводит в результате к истощению В-клеток без истощения плазмабластов. СС-93269 вызывал избирательное истощение плазмабластов при минимальном истощении В-клеток в субнаномольной концентрации (Фиг. 13В). СС-93269 быстро приводил к истощению плазмабластов из PBMC пациентов, страдающих от AAV, даже тогда, когда пациентов лечили иммуносупрессорами, например, ритуксимабом.

Пример 9: BCMA-TCE в отсутствие мишени не приводил в результате к увеличению частоты активированных Т-клеток среди PBMC пациента, страдающего от AAV

PBMC выделяли у пациента, страдающего от AAV, AAV-2, которого ранее лечили ритуксимабом, микофенолатом, дексаметазоном и метилпреднизолоном. Фиг. 14А иллюстрирует диаграммы FACS, демонстрирующие утрату CD19(+) CD20(-) CD27(+) плазмабластов и мишеней плазматических клеток у субъекта AAV-2 в исходном состоянии по сравнению с субъектом AAV-1. Диаграммы гейтируют на клетках CD3(-) CD19(+). Фиг. 14В иллюстрирует диаграмму FACS, демонстрирующую достоверное

присутствие CD4(+) и CD8(+) Т-клеток у субъекта AAV-2. Диаграмма гейтирована на клетках CD3(+).

РВМС у AAV-2 обрабатывали различными концентрациями ВСМА ТСЕ и после инкубации в течение 24 часов Т-клеточную активацию оценивали путем проточной цитометрии, как в примере 7. Фиг. 14С иллюстрирует частоту CD69(+) или CD25(+) на CD4(+) или CD8(+) Т-клетках. Эти данные демонстрируют то, что ВСМА-ТСЕ не приводит к Т-клеточной активации, когда плазмабласты/плазматические клетки-мишени отсутствуют.

Пример 10: Т-клеточная активация меньше тогда, когда экспрессирующие ВСМА раковые клетки уничтожаются при отношении эффектор:мишень, близком к AAV

Клетки JEKO-1 (2500 клеток/лунку) выращивали с РВМС при отношениях мишень:эффектор (Т:Е) 1:10 или 1:500 для имитации отношений Т:Е (ВСМА+ клетки: Т-клетки), обнаруживаемых, соответственно, при множественной миеломе (ММ) или AAV. После инкубации в течение 24 часов с СС-93269 или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3 клетки отмывали и затем оценивали экспрессию CD69 (фиг. 15А) и CD25 (фиг. 15В) на CD8(+) Т-клетках.

Эти данные указывают на то, что большие отношения Т:Е (ВСМА+ клетки:Т-клетки) приводят в результате к большей степени Т-клеточной активации. Следует отметить то, что частота активированных Т-клеток меньше тогда, когда отношение Т:Е сравнимо с отношением экспрессирующих ВСМА плазмабластов и Т-клеток, обнаруженным у здоровых добровольцев и пациентов, страдающих от AAV, чем тогда, когда отношение Т:Е имитирует пациентов ММ.

Пример 11: ВСМА-ТСЕ нейтрализует способность продуцирующих IgG плазмабластов и плазматических клеток регенерировать, несмотря на подходящий стимул фактора роста плазмабластов/клеток плазмы крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из цельной крови, отобранной у здоровых добровольцев, с использованием градиента фикола и обрабатывали различными концентрациями ВСМА ТСЕ (СС-93269, Mab101 или Mab102) или контрольным 2+1 антителом против HEL против CD3. Образец пациента D214 обрабатывали ВСМА ТСЕ при 90% эффективной концентрации (EC₉₀) для истощения плазмабластов.

После инкубации в течение 24 часов PBMC выращивали с факторами роста IL-2 (20 Е/мл), BAFF (200 нг/мл) и IL-21 (100 нг/мл) в течение 4-7 суток для того, чтобы вызвать дифференцировку плазмбластов/клеток плазмы крови из отрицательных по ВСМА предшественников. Некоторые культуры также стимулировали CpG (ODN200610 мкг/мл) в течение этого периода.

После выращивания плазмбласты и плазматические клетки (CD19(+) CD20(-) CD27(+)) или CD20⁺ В-клетки анализировали путем проточной цитометрии (фиг. 16А). ВСМА-ТСЕ подавлял восстановление плазмбластов и плазматических клеток после истощения несмотря на соответствующие факторы роста для их регенерации, в частности, при 90% эффективной концентрации (EC₉₀) для уничтожения плазмбластов.

Культуральные супернатанты собирали для измерения общей секреции IgG при помощи ELISA (фиг. 16В). ВСМА-ТСЕ подавляет продукцию антител IgG несмотря на стимуляцию CpG в частности при концентрации EC₉₀ для уничтожения плазмбластов. Последнее свидетельствует о том, что продукция аутоантитела IgG может подавляться путем истощения плазмбластов *in vivo* на 90%.

Пример 12: Зависимое от дозы опосредованное ВСМА ТСЕ уничтожение плазмбластов при ревматоидном артрите с минимальной Т-клеточной активацией

PBMC выделяли у пациентов, страдающих от ревматоидной артрита (РА), и обрабатывали различными концентрациями СС-93269. После инкубации в течение 24 часов уничтожение плазмбластов (Фиг. 17А), Т-клеточную активацию (Фиг. 17В) и секрецию цитокинов (Фиг. 17С) оценивали путем проточной цитометрии, как в примере 4.

50% Эффективная концентрация (EC₅₀) для СС-93269 в отношении уничтожения плазмбластов при РА составляет 0,001 нМ. Таким образом, уничтожение плазмбластов при РА происходит при концентрациях ВСМА ТСЕ меньше чем те, которые требуются для Т-клеточной активации или секреции цитокинов.

Пример 13: Действие на другие В-клеточные популяции среди PBMC пациентов, страдающих от РА, после выращивания с СС-93269

Обработанные СС-93269 образцы PBMC примера 12 окрашивали в отношении маркеров линии В-клеток (CD20, CD27 и IgD). Данные, представленные на Фиг. 18А-С, приведены в виде процентной доли от всех клеток CD19(+)CD20(+). Данные

демонстрируют то, что СС-93269 не истощал значительно наивные, некоммитированные или коммитированные популяции В-клеток памяти в РВМС пациентов, страдающих от РА, *in vitro* при концентрациях EC_{90} для уничтожения плазмабластов.

Пример 14: Зависимое от дозы опосредованное ВСМА ТСЕ уничтожение плазмабластов пациентов, страдающих от системной красной волчанки, происходит при минимальной Т-клеточной активации

РВМС выделяли у пациентов, страдающих от системной красной волчанки (SLE), и обрабатывали различными концентрациями СС-93269 или контрольным антителом 2+1. После инкубации в течение 24 часов уничтожение плазмабластов (Фиг. 20А) и Т-клеточную активацию (Фиг. 20В) оценивали, как в примере 4.

50% Эффективная концентрации (EC_{50}) СС-93269 для уничтожения плазмабластов при SLE составляет 0,01 нМ (n=5). Таким образом, уничтожение плазмабластов при SLE возникает при концентрациях ВСМА ТСЕ меньше чем те, которые требуются для Т-клеточной активации.

Пример 15: Избирательное истощение плазмабластов СС-93269 у яванского макака

РВМС выделяли из цельной крови яванского макака. Плазмабласты и CD20(+) В-клетки обрабатывали различными концентрациями СС-93269 или контрольного 2+1 антитела против HEL против CD3 в течение 24 часов.

Уничтожение плазмабластов оценивали при помощи FACS, посредством которого плазмабласты идентифицировали как CD19(+)IRF4(+), и приводили в виде процентной доли от всех CD19(+) клеток (фиг. 19А). Уничтожение CD20(+) В-клеток также оценивали при помощи FACS, посредством которого CD19(+)CD20(+) клетки приведены в виде процентной доли от всех CD19(+) клеток (фиг. 19В). Уничтожение плазмабластов IRF4+ происходит при более низкой концентрации СС-93269, чем та, которая необходима для уничтожения CD20(+) В-клеток. Таким образом, СС-93269 способен избирательно истощать плазмабласты IRF4+ без широкого истощения CD20(+) В-клеток.

Т-клеточную активацию оценивали при помощи FACS, посредством которого CD69(+)CD8(+) Т-клетки приведены в виде процентной доли от всех CD8(+) Т-клеток (Фиг. 19С).

Вместе эти данные демонстрируют избирательное уничтожение плазмабластов при помощи СС-93269 и минимальное увеличение частоты активированных Т-клеток при концентрациях СС-93269 для истощения плазмабластов IRF4+ без истощения CD20 (+) В-клеток в приемлемой фармакокинетической-фармакодинамической (PK/PD) модели. Они могут быть использованы для прогнозирования фармакологических и токсикологических действий ВСМА-ТСЕ *in vivo*.

Пример 16: Действие экзогенного растворимого ВСМА на опосредованное СС-93269 уничтожение плазмабластов здоровых добровольцев

РВМС выделяли у нормальных здоровых добровольцев и добавляли различные концентрации экзогенного растворимого ВСМА (sBCMA). Выбирали максимальную концентрацию sBCMA 67,6 нг/мл, поскольку она вдвое больше, чем верхний предел уровней sBCMA у пациентов, страдающих от аутоиммунного заболевания (данные не представлены). Уровни растворимого ВСМА в сыворотке или плазме крови пациентов-доноров, страдающих от аутоиммунного расстройства, оценивали при помощи иммуноанализа на микроносителях от Ampersand Biosciences (Lake Clear, NY). Образцы затем обрабатывали увеличивающимися концентрациями (0-50 нМ) СС-93269 или контрольного 2+1 антитела в течение 24 часов до уничтожения плазмабластов (фиг. 21А), и оценивали Т-клеточную активацию (Фиг. 21В).

Уничтожение плазмабластов оценивали при помощи FACS, посредством которого плазмабласты идентифицируют как клетки CD19(+) CD20(-) CD27(+), и приводили в виде процентной доли от всех клеток CD19(+), нормализованной к необработанному контролю (фиг. 21А). Уничтожение плазмабластов в присутствии sBCMA происходит в концентрациях СС-93269 меньше чем те, которые необходимы для уничтожения экспрессирующих ВСМА линий раковых клеток (например, клеток JEKO), даже в концентрациях sBCMA, которые могут быть представлены у пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний, и более высоких.

Для Т-клеточной активации клетки промывали и затем окрашивали в отношении линии Т-клеток (CD4 и CD8) и активации маркеров (CD69, CD25). Данные, представленные на Фиг. 21В, иллюстрирует частоту CD69(+) на CD4(+) Т-клетках или на CD8(+) Т-клетках.

В таблице 13 обобщены данные для СС-93269 и проиллюстрировано минимальное увеличение (т.е. меньше чем 20% выше базового уровня) частоты

активированных Т-клеток при увеличенных уровнях sBCMA при 90% эффективной концентрации (EC₉₀) BCMA TCE для истощения *in vitro* плазмабластов среди PBMC здоровых добровольцев.

Таблица 13: Действие экзогенного растворимого BCMA на уничтожение плазмабластов и Т-клеточную активацию в PBMC здоровых добровольцев с СС-93269

Растворимый BCMA (нг/мл)	Истощение плазмабластов		CD69+ CD8+ Т-клетки при:	
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₉₀ (нМ)	EC ₅₀ для истощения PB	EC ₉₀ для истощения PB
0	0,005	0,047	< 20%	< 20%
16,8	0,025	0,225	< 20%	< 20%
33,6	0,130	1,17	< 20%	< 20%
67,6	0,32	2,88	< 20%	< 20%

Пример 17: Минимальная опосредованная СС-93269 Т-клеточная активация и секреция цитокинов в цельных образцах крови здоровых добровольцев и пациентов, страдающих от AAV

Цельные образцы крови нормальных здоровых добровольцев (n=4) и пациентов, страдающих от AAV (n=2), обрабатывали различными концентрациями СС-93269 или контрольным 2+1 антителом. После инкубации в течение 24 часов Т-клеточную активацию оценивали, как в примере 4. Данные, представленные на фиг. 22А, представляют собой экспрессию CD69 на CD8(+) Т-клетках в цельных образцах крови нормальных здоровых добровольцев (NHV) и пациентов, страдающих от AAV.

Культуральные супернатанты анализировали в отношении продукции цитокинов (IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10 и гранзим В) с использованием анализа MSD Pro-inflammatory I (Фиг. 22В).

Вместе эти данные демонстрируют минимальное увеличение (т.е. меньше чем 20% выше базового уровня) частоты активированных Т-клеток и минимальную

продукцию цитокинов (т.е. меньше чем 20 пг/мл выше базового уровня), когда образцы цельной крови нормальных здоровых добровольцев обрабатывают СС-93269.

Пример 18: Антитела, обладающие улучшенной стабильностью

Оценивали физико-химические свойства четырех молекул ВСМАхCD3: Mab101, Mab102, 83A10-TCB_{scv} и 22-TCB_{scv}. Mab101 и 83A10-TCB_{scv} включают связывающий ВСМА домен, включающий CDR антител 83A10 и Mab102, и 22-TCB_{scv} включают связывающий ВСМА домен, включающий CDR антитела Mab22. Все четыре варианта имеют один и тот же связывающий CD3 домен. Выравнивания последовательностей четырех молекул ВСМАхCD3 представлены на Фиг. 27. Каждая молекула представлена в биспецифическом формате 2+1, как представлено на Фиг. 2А, но с альтернативными аминокислотными заменами в CL-CH1 для уменьшения ошибочного спаривания легкой цепи/побочных продуктов: A141W, L145E, K147T, Q175E («WETE») и F116A, Q124R, L135V, T178R («ARVR»), нежели чем «RK/EE» проиллюстрированные замены.

Использованные в этих примерах термины «HD1» и «платформа HD1» относятся к биспецифическому антителу, включающему мутации «выступ-во-впадину». В частности, используемые здесь термины «формат HD1» и «платформа HD1» относятся к биспецифическому антителу в формате Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА, причем:

(1) Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CL, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1;

(2) Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные замены 123R и 124K в домене CL и аминокислотные замены 147E и 213E в соответствующем домене CH1;

(3) первый домен CH3 в Fc включает модификацию T366W, а второй домен CH3 в Fc включает модификации T366S, L368A и Y407V.

Использованные в этих примерах термины «формат HD2» и «платформа HD2» относятся к биспецифическому антителу, включающему мутации гетеродимеризации в соответствии с настоящим изобретением. В частности, используемые здесь термины «формат HD2» и «платформа HD2» относятся к биспецифическому антителу в формате

Fab-фрагмент антитела против ВСМА - Fc - Fab-фрагмент антитела против CD3 - Fab-фрагмент антитела против ВСМА, причем:

(1) Fab-фрагмент антитела против CD3 включает легкую цепь и тяжелую цепь, причем легкая цепь представляет собой легкую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VH и константный домен CH1, и причем тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь, полученную путем кроссинговера, которая включает переменный домен VL и константный домен CH1;

(2) Fab-фрагмент антитела против ВСМА включает аминокислотные замены A141W, L145E, K147T, Q175E в домене CH1 и аминокислотные замены F116A, Q124R, L135V, T178R в соответствующем домене CL;

(3) первый домен CH3 в Fc включает модификации T350V, L351Y, F405A и Y407V и второй домен CH3 в Fc включает модификации T350V, T366L, K392L и T394W (нумерация в соответствии с нумерацией EU).

Как указано в таблице 14, биспецифических антитела Mab101 и Mab102 содержат мутации HD2 в соответствии с настоящим изобретением, тогда как биспецифические антитела 83A10-TCBcv и 22-TCBcv содержат мутации «выступ-во-впадину» (HD1). Модификации «выступ-во-впадину» подробно описаны в нескольких примерах в, например, WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621, Merchant, A.M. et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68 и WO 98/050431. Эти модификации состоят из первого домена CH3, включающего модификацию T366W («модификация выступа»), и второй домен CH3, включающий модификации T366S, L368A и Y407V («модификация впадины») (нумерация в соответствии с нумерацией EU в Kabat).

Таблица 14: Антитела

Антитело	Платформа для гетеродимеризации	Связывающий ВСМА	Связывающий CD3
83A10-TCBcv	HD1	83A10	CH2527
22-TCBcv	HD1	Mab22	CH2527
Mab101	HD2	83A10	CH2527
Mab102	HD2	Mab22	CH2527

Авторы изобретения продемонстрировали то, что связывающая способность биспецифических антител в формате в соответствии с настоящим изобретением (т.е. Mab101 и Mab102), определяемая при помощи поверхностного плазмонного резонанса, менее подвержена химическому воздействию (т.е. воздействию низкого pH, воздействию высокого pH и воздействию пероксидом *трет*-бутила), чем связывающая способность биспецифических антител, включающих соответствующие связывающие ВСМА домены в формате HD1 (т.е. 83A10-TCVsv и 22-TCVsv), таким образом, демонстрируя то, что формат HD2 вносит вклад в общее увеличение стабильности.

Авторы изобретения дополнительно продемонстрировали то, что применение формата HD2 компенсирует уменьшение физической стабильности, возникающее в результате CDR в Mab22. В частности, измерения концентрации белка при помощи гель-фильтрации (SEC) продемонстрировали явное уменьшение концентрации белка для HD1 биспецифических 22-TCVsv после встряхивания и воздействия низкого pH, которое не обнаруживалось для эквивалента платформы HD2 Mab102. Таким образом, применение платформы HD2 в эквиваленте молекулы Mab102 уменьшает отрицательное влияние CDR Mab22 на стабильность антитела.

Кроме того, общую оценку стабильности для каждой молекулы рассчитывали на основе комбинированного анализа данных, полученных в результате множественных анализов физической и химической стабильности (смотри таблицу 18). В этом анализе обе молекулы Mab101 и Mab102 платформ HD2 демонстрировали более высокие оценки, чем соответствующие эквиваленты платформы HD1 83A10-TCVsv и 22-TCVsv, свидетельствующие о том, что обе биспецифические молекулы являются более стабильными в формате HD2.

Пример 18.1: Химическая стабильность

Оценка химической стабильности состояла из поддержания низкого pH (при pH 4) для ускорения изомеризации аспарагиновой кислоты и реакций фрагментации и поддержания высокого pH (при pH 8) для ускорения деамидирования аспарагина, реакций окисления и образования тиоэфира. Пероксид *трет*-бутила (ТВР) также добавляли к буферу платформы с pH 6 для того, чтобы способствовать окислению метиониновых остатков, погруженных в растворитель.

Первичные способы, используемые для оценки химической стабильности, представляли собой поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с использованием

описанного здесь способа сравнения сенсограмм и гель-фильтрации (SEC) для случаев, когда химические модификации могут влиять на физическую стабильность или приводить к низкомолекулярному (LMW) отсечению. Пептидное картирование также использовали для отбора образцов в зависимости от связывания SPR.

Пример 18.1.1 Анализ изменений связывания ВСМА и CD3 при помощи поверхностного плазмонного резонанса

Эксперименты SPR осуществляли с использованием системы Biacore T200 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) с температурами отсека для анализа и отсека для образца, установленными, соответственно на 25°C и 7°C.

Антитела против человеческого IgG (из набора для связывания антитела против IgG) подвергали аминному связыванию с поверхностью чипа CM5 в соответствии с указаниями производителя. Молекулы биспецифических антител, разведенные до 1 мкг/мл в подвижном буфере, наносили на поверхность чипа путем инъекции в течение 60 с. После процедуры одноциклового кинетики антиген затем пять раз инжестировали (30 с на инъекцию) при постепенно увеличивающихся концентрациях при скорости потока 30 мкл/мин. Концентрации антигена находились в диапазоне от 0,08 до 50 нМ для ВСМА и от 12,7 до 1000 нМ для CD3. Время диссоциации 300 с добавляли после инъекции последнего антигена. После каждого эксперимента все проточные ячейки регенерировали с использованием инъекции 3М MgCl₂ в течение 30 с.

Перед анализом данные дважды корректировали путем сначала вычитания данных из референсной проточной ячейки и затем вычитания контрольного цикла, во время которого буфер инжестировали вместо антигена. Сравнительный анализ сенсограмм осуществляли с использованием Biacore T200 (версия программного обеспечения 3.0). Все данные нормализовали в отношении ответа, где 100% отражает максимальное связывание, полученное во время инъекции, и 0% отражает базовый уровень. Сенсограммы среднего значения и ± 3 стандартных отклонения (SD) рассчитывали для десяти или более чем десяти независимых сенсограмм для каждой молекулы не подвергнутого стрессовому воздействию материала (стандарт). Для количественного определения сходства связывания подвергнутых стрессовому воздействию образцов с соответствующим не подвергнутым стрессовому воздействию стандартом сенсограммы для образца оценивали вместе сенсограммами для стандарта. Степень сходства рассчитывали на основе того, сколько точек данных для образца

оказываются внутри или снаружи ± 3 пределов стандартного отклонения в соответствии с уравнением 2, где SSQ представляет собой сумму квадратов (Karlsson, R., Pol, E., and Frostell, Å. (2016); Analytical Biochemistry 502, 53-63). Все материалы для анализа SPR приведены в таблице 15.

Таблица 15: материалы SPR

Материал	Подробная информация	Источник
Сенсорный чип	Series S CM5	GE Healthcare
Буфер для анализа	HBS-EP + буфер (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM этилендиаминтетрауксусная кислота [EDTA] и 0,05% [об./об.] поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4)	GE Healthcare
Способ захвата	Аминное сочетание	GE Healthcare
Раствор для захвата	Антитело против человеческого IgG (Fc)	GE Healthcare
Образец антитела	TRP-2204, 2205, 2261, и 2253 в конц 1 мкг/мл	Celgene
Антиген 1	Человеч. BCMA, TRP208 (0,08, 0,4, 2, 10, 50 нМ)	Celgene
Антиген 2	Человеч. CD3EД, TRP401 (12,3, 37, 111, 333, 1000 нМ)	Celgene

Типичные сенсограммы SPR, на которых сравнивается вариант 83A10-TCB_{sv}, который хранили в течение 2 недель при 2-8°C (pH 6) и при 40°C (pH 8), представлены, соответственно, на Фиг. 26А и Фиг. 26В.

Уравнение 2:

$$\text{Оценка схождения} = \% \text{ точек внутри пределов} + \% \text{ точек за пределами} \\ \times \frac{\text{SSQ дистанции предела для усреднения}}{\text{SSQ дистанции образца для усреднения}} \\ (2)$$

Как представлено в таблице 18, 22-TCB_{sv} (включающие мутации платформы HD1) демонстрировал самое большое общее уменьшение связывания CD3 и BCMA среди всех стрессовых условий, за исключением воздействия пероксидом *трет*-бутила, и обладал самой низкой общей оценкой химической стабильности. Наоборот, Mab101 (включающее мутации платформы HD2 в соответствии с настоящим изобретением) демонстрировали наименьшее изменение связывания среди всех стрессовых условий.

Оба биспецифических антитела, включающие мутации HD2, (т.е., Mab101 и Mab102), обладали большей общей оценкой химической стабильности, чем соответствующая молекула HD1, включающая те же самые области CDR, свидетельствуя о том, что платформа HD2 вносит вклад в увеличение химической стабильности антитела.

Таким образом, данные связывания SPR свидетельствуют о том, что связывающая способность биспецифических антител, включающих мутации HD2 (т.е. Mab101 и

Mab102), менее подвержена химическому стрессу (т.е. хранение при низком pH, хранение при высоком pH и воздействие пероксидом *трет*-бутила), чем связывающая способность биспецифических антител, включающих соответствующие домены, связывающие ВСМА с мутациями HD1 (т.е. 83A10-TCVsv и 22-TCVsv). Соответственно, эти данные указывают на то, что мутации HD2 в соответствии с настоящим изобретением улучшают стабильность биспецифических антител по сравнению с мутациями HD1, используемыми в связи с биспецифическими антителами CD3xBCMA, включающими CDR в 83A10 или Mab22.

Пример 18.1.2 Пептидное картирование с восстановлением

Для того, чтобы дополнительно дифференцировать химические стабильности биспецифических антител, осуществляли пептидное картирование с восстановлением на всех четырех биспецифических антителах. Молекулы в течение двух недель хранили при 40°C в буфере с pH 8 и с pH 6 в присутствии ТВР. В качестве контроля также анализировали образцы с, которые хранили в течение двух недель при pH 6 и 2-8°C.

Во всех образцах буфер меняли на 50 mM ацетатный с pH 5,0 с использованием фильтра с номинально отсекаемой молекулярной массой (MWCO) 10 кДа. Затем образцы разрушали в соответствии с предложенным производителем протоколом AccuMAP (Promega, Madison, WI). Кратко, образцы денатурировали при помощи GdHCl, восстанавливали при помощи ТСЕР (*трис* 2-карбоксиэтилфосфин) и алкилировали йодацетамидом. Предварительное разрушение в течение одного часа осуществляли при помощи LysC с последующим разведением GdHCl до меньше чем 1M и добавлением метионина до концентрации 15 mM. Смесь трипсин/LysC затем добавляли для окончательного разрушения в течение 3 часов при 37°C. Все стадии осуществляли при pH 5. Расщепление останавливали путем добавления TFA до конечной концентрации 2%.

Приблизительно 30 мкг разрушенного образца инжектировали в колонку Waters CSH C18 (2,1 x 150 мм, радиус пор 130 Å (13 нм), диаметр зерна 1,7 мкм) в потоке в масс-спектрометр Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Растворитель А для LC (жидкостной хроматографии) представлял собой 0,1% муравьиную кислоту (FA) в воде, и растворитель В представлял собой 0,1% FA в ACN (ацетонитрил). Разделяющий градиент начинается с 1% В, линейно увеличивается до 27% В в течение 110 минут и затем в течение пяти минут продолжали линейный градиент от 30% до 40% В. Температуру колонки устанавливали равной 70°C. Масс-спектры записывали в

соответствии с Top-10 информационно-зависимой регистрацией. MS1 осуществляли в орбитрэпе с разрешающей способностью, установленной на уровне 60000 при 400 m/z. CID (диссоциация, индуцированная столкновениями) MS/MS анализировали в ионной ловушке при быстрой скорости сканирования. Динамическое исключение устанавливали равным 15 секундам и окно масс составляло 10 млн⁻¹. Необработанные данные анализировали при помощи программных пакетов Protein Metrics Byonic и Byologic software. Уровни модификаций рассчитывали в соответствии описанным далее с использованием интенсивности XIC: интенсивность модиф. пепт./ (интенсивность модиф. пепт. + интенсивность немодиф. пепт.) x 100%.

Таблицы 10 и 11 демонстрируют модификации остатков внутри или около CDR соответственно ВСМА и CD3. В согласии с данными SPR 22-TCBcv демонстрировал наибольшую предрасположенность к химической модификации в регионах CDR ВСМА и CD3, в частности, в отношении окисления метионина и триптофана. Наоборот, единственная модификация, которая была обнаружена, с большим уровнем в молекуле Mab101 представляла собой M34 в ВСМА HC и HHC после обработки TBP (таблица 16).

Таблица 16: Модификации около ВСМА CDR

Цель	Модификации около ВСМА CDR			Степень модификации %											
	Остаток(и)	Модиф.(и)	Расстоян.	Mab101			Mab102			83A10-TCBcv			22-TCBcv		
				pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
HC/HHC	M34	Окс.	0	0.9	1.0	10.4	1.1	0.9	6.0	0.9	1.1	6.5	1.0	1.0	4.7
HC/HHC	W36	Диокс.	+1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2
HC/HHC	M34+W36	Окс. + Диокс.	0,+1	0.4	0.6	1.6	0.3	0.2	0.6	0.1	0.0	0.4	0.2	0.2	0.7
HC/HHC	W47	Диокс.	-3	0.4	0.5	0.9	1.5	1.1	3.0	0.7	0.6	1.1	1.1	1.4	2.1
HC/HHC	(W102,W106)	Окс.	0,+1	0.3	0.3	1.0	0.4	0.2	3.5	0.2	0.3	1.8	0.2	0.3	5.3
LC1	W36	Окс.	+1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	1.9	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	3.4
LC1	W36	Диокс.	+1	0.8	0.9	1.4	1.1	0.8	1.9	1.4	1.1	1.2	1.1	1.2	1.7

(⁰) Только один из остатков модифицирован

+ Оба остатка существуют в модифицированной форме вместе

Таблица 17: Модификации около CD3 CDR

Цепь	Модификации около CDR3 CDR			Степень модификации %											
	Остаток(и)	Модиф.(и)	Расстоян.	Mab101			Mab102			83A10-TCBcv			22-TCBcv		
				pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
ННС	(W323,W327)	Диокс.	(0,0)	2.7	2.5	10.5	6.9	6.1	25.0	3.0	2.3	24.3	2.1	2.6	26.2
LC2b	M34	Окс.	0	0.5	1.2	22.8	0.9	1.0	27.5	1.0	1.9	31.3	0.9	1.1	40.7
LC2b	W36	Диокс.	+1	-	-	-	0.4	0.6	5.1	-	-	-	0.5	0.0	13.2
LC2b	M34+W36	Окс. + Диокс.	0,+1	0.5	0.6	2.9	1.2	1.1	5.5	0.9	1.2	7.2	1.1	1.3	12.7
LC2b	M34+W36	Окс.+Триокс.	0,+1	0.0	0.0	2.8	0.2	0.2	4.5	0.1	0.0	4.6	0.0	0.0	7.1
LC2b	W47	Окс.	-3	0.2	0.3	10.0	0.4	0.2	18.9	0.2	0.4	19.8	0.2	0.2	23.8
LC2b	W47	Диокс.	-3	3.2	3.5	15.6	7.3	5.5	26.8	5.3	4.5	27.4	5.6	5.3	31.9
LC2b	(N56,N57)	Деамид.	(0,0)	0.0	1.2	0.0	0.0	1.7	0.6	0.0	1.6	0.5	0.0	1.2	0.8

⁰ Только один из остатков модифицирован

+ Оба остатка существуют в модифицированной форме вместе

- Не идентифицирован в этом образце

Пример 18.2: физическая стабильность

Оценка физической стабильности состояла из измерения термической стабильности путем дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и коллоидной стабильности путем осаждения полиэтиленгликолем (PEG) в платформе с буфером с pH 6. Физическую стабильность также оценивали после стрессовых воздействий встряхивания замораживания/оттаивания (F/T) в платформе с буфером с pH 6. Наконец, кратковременное хранение при низком значении pH при комнатной температуре использовали для имитации вирусной инактивации. Именно эта стадия обработки часто приводит в результате к не нативной агрегации для меньшей конформационно стабильной стабильности белка.

Пример 18.2.1 Оценка термической стабильности при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии

Дифференциальную сканирующую калориметрию осуществляли с использованием TA Instruments NanoDSC (New Castle, DE) с использованием программного обеспечения NanoAnalyze. Образцы ВСМАхCD3 разбавляли до 1 мг/мл в 100 мМ гистидиновом буфере с pH 6,0 (таблица 19). Перед анализом образцов соответствующие буферы без белка дегазировали в течение 30 минут. Образцы и буферы нагревали от 10 до 100°C со скоростью 1°C·мин⁻¹. После регистрации данные для соответствующих буферов вычитали из каждого из образцов и данные нормализовали для превращения в ккал·моль⁻¹·°C⁻¹. Результат приведен в виде температуры (°C) в начале первого конформационного перехода с разворачиванием.

Как представлено на Фиг. 24 все четыре молекулы обладают близкими температурами начала термического разворачивания (приблизительно 60°C), тем не

менее, переход с разворачиванием большинства эндотермических доменов имеют величины T_m^{app} приблизительно на 5°C больше в молекуле Mab101 и 83A10-TCVsv (включающей ВСМА CDR 83A10).

Пример 18.2.2 Оценка коллоидной стабильности путем осаждения PEG

Оценку коллоидной стабильности для четырех молекул ВСМАхCD3 осуществляли путем осаждения PEG 6000. Эксперименты по осаждению при помощи PEG осуществляли путем приготовления 160 мкл растворов, состоящих из 1,0 г/мл молекулы ВСМАхCD3, забуференной до pH 6,0 при помощи 100 mM гистидина с постепенно увеличивающимися концентрациями PEG-6000 из 40% (масс./об.) раствора концентрированного раствора (таблица 19). Растворы помещали на 4°C в течение ночи и затем центрифугировали в течение 60 минут при 25000 об./мин. Количество белка, оставшегося в супернатанте, затем измеряли путем поглощения при 280 нм с использованием Agilent Cary UV-8454 (Agilent, Palo Alto, CA). Данные подгоняли к эмпирическому четырехпараметрическому сигмоидальному уравнению (уравнение 1) для определения и вывода процентной доли (масс./об.) PEG-6000, необходимого для осаждения половины исходного количества белка (C_m). Параметры b , m и r представляют соответственно базисные кривые, максимальную величину и скорость.

Оценка 1

$$y = b + \left[\frac{m}{\left(1 + \exp\left(\frac{Cm - x}{r} \right) \right)} \right] \quad (1)$$

Как представлено на Фиг. 25, Mab102 и 22-TCVsv (включающие ВСМА CDR в Mab22) обладают самой низкой коллоидной стабильностью в платформе с гистидиновыми буферами с pH 6, оцениваемой путем осаждения PEG. Для Mab101 и 83A10-TCVsv (включающих ВСМА CDR в 83A10) требовалось почти вдвое больше PEG для того, чтобы вызвать осаждение в нативном состоянии путем осаждения путем эффектов исключенного объема.

Пример 18.2.3 Оценка физической стабильности путем гель-фильтрационной хроматографии после встряхивания и замораживания-оттаивания

Физическую стабильность также оценивали при помощи гель-фильтрационной хроматографии после стрессовых факторов в виде встряхивания и замораживания/оттаивания (F/T) в платформе с буфером с pH 6.

Замораживание-оттаивание

400 мкл каждой из 1 мг/мл молекул ВСМАхCD3 (таблица 19) дозировали в 0,5 мл отдельно стоящей криопробирки с резьбовой крышкой Fisherbrand (партия #02-707-357) и хранили в одноярусном контейнере для образца с разделителями для пробирок и замораживали при -80°C . В общей сложности осуществляли пяти циклов замораживания-оттаивания (F/T), где каждый цикл состоял из замораживания образцов в течение, по меньшей мере, одного часа перед оттаиванием при комнатной температуре и осторожном встряхивании перед следующим циклом F/T. Образцы анализировали при помощи SEC после пятого цикла F/T.

Встряхивание

400 мкл каждой из 1 мг/мл молекул ВСМАхCD3 (таблица 19) переносили в стандартные пробирки Eppendorf объемом 1,5 мл (партия # 022364111) и помещали в микропланшетный шейкер VWR с контролем температуры. Шейкер устанавливали на 1500 об./мин при 25°C в течение 24 часов. После встряхивания образцы анализировали при помощи SEC.

Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационную хроматографию (SEC) осуществляли с использованием системы Agilent 1260 HPLC (Agilent, Palo Alto, California), оборудованной одной колонкой TSKgel G3000SWxl 7,8 x 300 мм, 5 мкм. Подвижная фаза состояла из 100 mM KH_2PO_4 , 250 mM NaCl pH 6.8. Двадцать микролитров каждого образца инжескировали в колонку при 25°C и изократически элюировали при скорости потока 0,5 мл/мин в течение 30 минут. Элюцию контролировали при помощи УФ детекции при 280 нм, и концентрацию белка рассчитывали с использованием общей площади интегрированной кривой, скорости потока, инжескируемого объема, длины светового пути проточной ячейки и коэффициентов экстинкции для каждой из молекул ВСМАхCD3.

Для анализа при помощи SEC приводили две величины: уменьшение % мономера и концентрация относительно образца, хранимого при pH 6 в течение 2 недель при 2-8°C. Данная методология позволяет уменьшить время и потребности в необходимых материалах путем устранения образцов в «нулевой момент времени», а также минимизации возможных хроматографических переменных (таких как эффективность колонки) путем анализа всех образцов в пределах одной и той же хроматографической последовательности.

Для учета возможной вариабельности разведения (а также вариабельности интегрирования и инъекции) также готовили десять не зависимых разведений 1:10 из одного и того же стандартного раствора mAb 10 мг/мл и анализировали их в той же самой последовательности SEC как образцы для анализа стабильности ВСМАхCD3. Уменьшение процентной доли мономера концентрации регистрировалось относительно двукратного стандартного отклонения (2σ) относительно, соответственно, средней процентной доли мономера ($2\sigma_M$) и концентрации ($2\sigma_C$) этих разведенных стандартов.

Результаты, полученные при помощи SEC, приведены в таблице 15, а различия в процентной доле мономера основного пика и концентрации между образцом при pH 6 в течение 2 недель при 2-8°C (контрольным) и каждым из подвергнутых стрессовому воздействию образцов представлены в таблице 18.

В соответствии с данными SPR результаты свидетельствуют о том, что SEC существует явное уменьшение концентрации белка для молекулы 22-TCVsv платформы HD1 в результате встряхивания после pH 3, что не обнаруживалось для других молекул. Таким образом, применение платформы HD2 для эквивалентной Mab101 молекулы минимизирует негативное воздействие Mab22 CDR на стабильность. Типичная хроматограмма варианта 22-TCVsv представлена на Фиг. 26.

Бальная оценка

Молекулы оценивали по бальной системе в соответствии с критериями приемлемости в отношении каждого из результатов для способа определения физической и химической стабильности (светло-серая затененная область таблицы 18) и присваивали оценку 0, 1 или 2 на основе того, насколько экспериментальные результаты (темно-серые затененные области) соответствуют этим критериям. Уменьшение в процентной доле мономера и концентраций, измеренных при помощи SEC подвергали бальной оценке относительно двукратных стандартных отклонений относительно

средней процентной доли мономера ($2\sigma_M$) и концентрации ($2\sigma_C$), определенных для десяти независимых разведений 1:10 стандартного раствора 10 мг/мл mAb; для текущего исследования $2\sigma_M$ и $2\sigma_C$ составляли, соответственно, 0,33 и 0,14. Суммы бальных оценок физической и химической стабильности делили на соответствующее количество результатов (8 для определения физической и 16 для определения химической стабильности), таким образом, что бальные оценки как физической, так и химической стабильности находятся в диапазоне 0-2. Таким образом, общая бальная оценка для каждого варианта представляет собой сумму бальных оценок физической и химической стабильностей и, таким образом, находится в диапазоне 0 - 4 (таблица 18). Все результаты в таблице 18 взвешивали в равной степени.

В таблице 18 представлено определение физической стабильности, существовало явное уменьшение концентрации белка для молекулы 22-ТСВсv после встряхивания и после хранения при pH 3, которое не обнаружено для других молекул.

22-ТСВсv также показывал неудовлетворительные результаты в отношении других молекул при определении химической стабильности, демонстрируя большие потери в процентной доле мономера после окисления при помощи ТВР, и большие потери связывания CD3 и ВСМА после хранения при низком и высоком pH. Как и в отношении определения физической стабильности, Mab101 демонстрировал минимальное изменение концентрации, процентной доли мономера и связывания всех химических стрессовых воздействий. Обе молекулы платформы HD2, т.е. Mab101 и Mab102, демонстрировали более высокую бальную оценку, чем соответствующие эквиваленты платформы HD1 (таблица 18).

Таким образом, эти данные ясно демонстрируют то, что формат платформы HD2 приводил в результате к более стабильной молекуле, чем формат платформы HD1 в отношении биспецифических антител 83A10 и Mab22.

Таблица 18: Оценка физической и химической стабильности в способе оценки физической стабильности ВСМАхCD3	Оценка			Mab10 1	Оценка Mab101	Mab10 2	Оценка Mab102	83A10 - ТСВсv	Оценка 83A10-ТСВсv	22-ТСВсv	Оценка 22-ТСВсv
	0	1	2								
pH 6 DSC начало Tm1 (°C)	< 50	50 -55	> 55	59,30	2	59,20	2	60,00	2	60,10	2

рН 6 PEG-6000 Cm (% масс./об.)	< 10	10 - 20	> 20	12,20	1	8,60	0	14,40	1	4,10	0
рН 6 -80°C F/T уменьшение в % основного ¹	> 5	> 2σM - 5	≤ 2σM	0,37	1	-2,40	2	1,42	1	-1,33	2
рН 6 -80°C F/T уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	-0,07	2	0,02	2	-0,01	2	0,01	2
рН 6 RT встряхивание уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	0,02	2	-1,53	2	1,20	2	-1,98	2
рН 6 RT встряхивание уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	0,03	2	-0,09	2	0,00	2	0,29	0
рН 3, 3 ч. уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	3,40	2	5,32	1	3,09	2	1,47	2
рН 3, 3 ч. уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	0,04	2	0,07	2	-0,01	2	0,23	0
Оценки физической стабильности					1,75		1,63		1,75		1,25

Способ химической стабильности	Оценка			Mab10 1	Оценка Mab101	Mab10 2	Оце нка Mab 102	83A10 - TCBc v	Оцен ка 83A1 0- TCBc v	22- TCB cv	Оцен ка 22- TCB cv
	0	1	2								
рН 6 уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	-0,22	2	-1,57	2	0,11	2	0,96	2
рН 6 уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	0,02	2	0,05	2	0,03	2	0,04	2
рН 6 SPR % сходства-BCMA	< 90	90 -95	> 95	99,99	2	99,44	2	99,96	2	99,85	2
рН 6 SPR % сходства-CD3	< 90	90 -95	> 95	99,96	2	99,95	2	99,90	2	99,50	2
рН 6-TBP уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	9,12	1	11,62	0	12,40	0	21,03	0
рН 6-TBP уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	0,02	2	0,08	2	0,06	2	0,06	2
рН 6-TBP SPR % сходства-BCMA	< 80	80 - 90	> 90	82,50	1	54,00	0	72,00	0	71,93	0
рН 6-TBP SPR % сходства-CD3	< 80	80 - 90	> 90	75,30	0	72,30	0	59,70	0	58,50	0
рН 4 уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	9,12	1	8,73	1	7,97	1	9,38	1
рН 4 уменьшение в мг/мл	> 2σC	—	≤ 2σC	-0,06	2	0,07	2	0,04	2	-0,07	2
рН 4 SPR % сходства-BCMA	< 80	80 - 90	> 90	99,99	2	99,98	2	99,42	2	84,76	1
рН 4 SPR % сходства-CD3	< 80	80 - 90	> 90	99,93	2	99,98	2	100	2	99,60	2

рН 8 уменьшение в % основного	> 10	5 - 10	< 5	7,83	1	9,08	1	8,88	1	9,00	1	
рН 8 уменьшение в мг/мл	> 2σС	—	≤ 2σС	-0,04	2	0,13	2	0,12	2	0,04	2	
рН 8 SPR % сходства-BCMA	< 80	80 - 90	> 90	99,92	2	95,70	2	90,80	2	95,81	2	
рН 8 SPR % сходства-CD3	< 80	80 - 90	> 90	71,50	0	70,11	0	57,48	0	59,50	0	
Оценки химической стабильности					1,50			1,38			1,38	1,31
Общие оценки проявляемости					3,25			3,00			3,13	2,56

¹ Следует отметить то, что критерий приемлемости для утраты SEC % главного пика мономера для F/T является более строгим, чем для всех других стрессовых условий.

² Температура хранения для всех способов определения химической стабильности составляла 40°C.

Таблица 19: Сводная таблица для композиции, описывающая то, каким образом был приготовлен каждый кандидат.

Вариант #1	Идентификатор образца:	Mab101	концентрация после замены буфера (мг/мл)		13				
Композиции для исследований химической стабильности, F/T, DSC и встряхивания			Отбор осаждения PEG						
Композиция	объем #1 (мл)	ТВР концентрированный раствор (мкл)	объем		% PEG-6000 (масс./об.)	объем варианта #1 (мл)	объем 40% PEG концентрированный раствор (мл)	объем 100 mM His pH 6 (мл)	конечный объем (мл)
			ТВР концентрированный раствор (мкл)	мМ конечный объем (мл)					
рН 6	0,177	—	2,123	2,300	0	12	0	148	160
рН 6 ТВР	—	3,000	—	0,303	5	12	20	128	160
рН 4	0,023	—	0,277	0,300	10	12	40	108	160
рН 8	0,023	—	0,277	0,300	15	12	60	88	160
рН 3	0,023	—	0,277	0,300	20	12	80	68	160
2,3 мл композиции с рН 6,0 должны быть распределены на аликвоты 5 x 0,3 мл и 2 x 0,4 мл аликвоты. 3,0 мкл 0,5 М ТВР должны быть внесены в одну из аликвот 0,3 мл. Аликвоты 0,4 мл будут использоваться для исследований F/T и встряхивания.			25	12	100	48	160		
			30	12	120	28	160		
			35	12	140	8	160		

Вариант #2	Идентификатор образца:	Mab102
------------	------------------------	--------

Композиции для исследований химической стабильности, F/T, DSC и встряхивания

Композиция	объем #2 (мл)	варианта	ТВР концентрированный раствор (мкл)	объем	
				м 100 мМ буферов (мл)	конечный объем (мл)
рН 6	0,193	—	—	2,107	2,300
рН 6 ТВР	—	—	3,000	—	0,303
рН 4	0,025	—	—	0,275	0,300
рН 8	0,025	—	—	0,275	0,300
рН 3	0,025	—	—	0,275	0,300

2,3 мл композиции с рН 6,0 должны быть распределены на аликвоты 5 x 0,3 мл и 2 x 0,4 мл аликвоты. 3,0 мкл 0,5 М ТВР должны быть внесены в одну из аликвот 0,3 мл. Аликвоты 0,4 мл будут использоваться для исследований F/T и встряхивания.

Вариант #3	Идентификатор образца:	83A10-TCBCV
------------	------------------------	-------------

Композиции для исследований химической стабильности, F/T, DSC и встряхивания

Композиция	объем #3 (мл)	варианта	ТВР концентрированный раствор (мкл)	объем	
				м 100 мМ буферов (мл)	конечный объем (мл)
рН 6	0,180	—	—	2,120	2,300
рН 6 ТВР	—	—	3,000	—	0,303
рН 4	0,023	—	—	0,277	0,300
рН 8	0,023	—	—	0,277	0,300
рН 3	0,023	—	—	0,277	0,300

2,3 мл композиции с рН 6,0 должны быть распределены на аликвоты 5 x 0,3 мл и 2 x 0,4 мл аликвоты. 3,0 мкл 0,5 М ТВР должны быть

концентрация после замены буфера (мг/мл)	11,9
--	------

Отбор осаждения PEG

% PEG-6000 (масс./об.)	объем варианта #2 (мл)	объем 40 % (масс./об.) PEG концентрированный раствор (мл)	объем	
			ем 100 мМ His рН 6 (мл)	конечный объем (мл)
0	13	0	147	160
5	13	20	127	160
10	13	40	107	160
15	13	60	87	160
20	13	80	67	160
25	13	100	47	160
30	13	120	27	160
35	13	140	7	160

концентрация после замены буфера (мг/мл)	12,8
--	------

Отбор осаждения PEG

% PEG-6000 (масс./об.)	объем варианта #3 (мл)	объем 40 % (масс./об.) PEG концентрированный раствор (мл)	объем	
			ем 100 мМ His рН 6 (мл)	конечный объем (мл)
0	13	0	148	160
5	13	20	128	160
10	13	40	108	160
15	13	60	88	160
20	13	80	68	160
25	13	100	48	160
30	13	120	28	160

внесены в одну из аликвот 0,3 мл. Аликвоты 0,4 мл будут использоваться для исследований F/T и встряхивания.

35 13 140 8 160

Вариант #4	Идентификатор образца:	22-TCBCV
Композиции для исследований химической стабильности, F/T, DSC и встряхивания		

концентрация после замены буфера (мг/мл)	5,4
--	-----

Отбор осаждения PEG

Композиция	объем #4 (мл)	варианта	ТВР концентрированный раствор (мкл)	объем	
				м 100	конечный объем
рН 6	0,426	—	—	1,874	2,300
рН 6 ТВР	—	3,000	—	—	0,303
рН 4	0,056	—	—	0,244	0,300
рН 8	0,056	—	—	0,244	0,300
рН 3	0,056	—	—	0,244	0,300

% PEG-6000 (масс./об.)	объем варианта #4 (мл)	объем 40 % PEG концентрированный раствор (мл)	% об.	объем	
				100	конечный объем
0	30	0	130	160	
5	30	20	110	160	
10	30	40	90	160	
15	30	60	70	160	
20	30	80	50	160	
25	30	100	30	160	
30	30	120	10	160	
35	-	-	-	-	

2,3 мл композиции с рН 6,0 должны быть распределены на аликвоты 5 x 0,3 мл и 2 x 0,4 мл аликвоты. 3,0 мкл 0,5 М ТВР должны быть внесены в одну из аликвот 0,3 мл. Аликвоты 0,4 мл будут использоваться для исследований F/T и встряхивания.

Таблица 20: SEC приводит в результате ко стрессовым условиям оценки проявляемости

Идентификатор образца: Mab101

Стрессовое условие	SEC HMW площадь (мAu*мин)	SEC основная площадь (мAu*мин)	SEC LMW площадь (мAu*мин)	SEC общая площадь (мAu*мин)	SEC % HMW	SEC % основного	SEC % LMW	SEC (мг/мл)	Параметр	объем	единицы
рН 6 2-8°C	16,5	2056,8	95,7	2169	0,761	94,827	4,412	0,984	Коэфф. экстинкции	1,530	мл*мг ⁻¹ *см ⁻¹
рН 6 40°C	12,9	2010,8	91,8	2115,5	0,610	95,051	4,339	0,960	Длина пути	0,6	см
рН 6-ТВР 40°C	149	1826,6	155,7	2131,3	6,991	85,704	7,305	0,967	скорость потока	0,5	мл/мин
рН 4 40°C	61,2	1967,4	266,8	2295,4	2,666	85,711	11,623	1,042	Инъект. об.	0,020	мл
рН 8 40°C	107,3	1972,2	187,5	2267,3	4,733	86,996	8,271	1,029			

рН 3 3 ч 25°C	74,5	1910,6	104,6	2089, 7	3,56 5	91,4 29	5,006	0,94 8
рН 6,0 -80 F/T 5x	25	2197,7	103,9	2326, 6	1,07 5	94,4 60	4,466	1,05 6
рН 6,0 RT встряхива ние	14,4	1986,3	94,4	2095, 1	0,68 7	94,8 07	4,506	0,95 1

Идентификатор образца: Mab102

Стрессовое условие	SEC HMW площадь (мАи*мин)	SEC основная площадь (мАи*мин)	SEC LMW площадь (мАи*мин)	SEC общая площадь (мАи*мин)	SEC % HMW	SEC % основное	SEC % LMW	SEC (мг/мл)	Параметр	объем	единицы
рН 6 2-8°C	133,8	1995,3	101,8	2230,9	5,998	89,439	4,563	1,000	Коэфф. экстинкции	1,550	мл*мг ⁻¹ *см ⁻¹
рН 6 40°C	123	1923,2	67	2113,2	5,821	91,009	3,171	0,947	Длина пути	0,6	см
рН 6-ТВР 40°C	289,5	1592,1	164,3	2045,9	14,150	77,819	8,031	0,917	скорость потока	0,5	мл/мин
рН 4 40°C	142,2	1677,8	258,8	2078,8	6,840	80,710	12,449	0,931	Инъект. об.	0,020	мл
рН 8 40°C	139,8	1555,6	240,3	1935,7	7,222	80,364	12,414	0,867			
рН 3 3 ч 25°C	216,7	1739,6	111,8	2068,1	10,478	84,116	5,406	0,927			
рН 6,0 -80 F/T 5x	130,7	2010,3	48	2189	5,971	91,836	2,193	0,981			
рН 6,0 RT встряхивание	148,6	2204	70,2	2422,8	6,133	90,969	2,897	1,085			

Идентификатор образца: 83A10-ТСВс

Стрессовое условие	SEC HMW площадь (мАи*мин)	SEC основная площадь (мАи*мин)	SEC LMW площадь (мАи*мин)	SEC общая площадь (мАи*мин)	SEC % HMW	SEC % основное	SEC % LMW	SEC (мг/мл)	Параметр	объем	единицы
рН 6 2-8°C	0	2126,5	52,7	2179,2	0,000	97,582	2,418	1,029	Коэфф. экстинкции	1,470	мл*мг ⁻¹ *см ⁻¹
рН 6 40°C	0	2054,6	53,4	2108	0,000	97,467	2,533	0,996	Длина пути	0,6	см

pH 6-ТВР 40°C	177	1756,9	128,6	2062, 5	8,58 2	85,1 83	6,235	0,97 4
pH 4 40°C	0	1875,2	217,3	2092, 5	0,00 0	89,6 15	10,38 5	0,98 9
pH 8 40°C	54,8	1715,4	163,6	1933, 8	2,83 4	88,7 06	8,460	0,91 4
pH 3 3 ч 25°C	47,35	2069,45	73,3	2190, 1	2,16 2	94,4 91	3,347	1,03 5
pH 6,0 -80 F/T 5x	31,3	2118,9	53,3	2203, 5	1,42 0	96,1 61	2,419	1,04 1
pH 6,0 RT встряхива ние	21,3	2103,3	57,6	2182, 2	0,97 6	96,3 84	2,640	1,03 1

скорость потока	0,5	мл/мин
Иньект. об.	0,02 0	мл

Идентификатор образца: 22-ТСВсv

Стрессовое условие	SEC HMW площадь (мAu*мин)	SEC основная площадь (мAu*мин)	SEC LMW площадь (мAu*мин)	SEC общая площа дь (мAu* мин)	SEC % HM W	SEC % осно вног о	SEC % LMW	SEC (мг/ мл)	Параметр	объем	единицы
pH 6 2- 8°C	18,1	1907,6	47,2	1972, 9	0,91 7	96,6 90	2,392	0,93 8	Коэфф. экстинкц .	1,46 0	мл*мг ⁻¹ *см ⁻¹
pH 6 40°C	14,6	1811	66,2	1891, 8	0,77 2	95,7 29	3,499	0,90 0	Длина пути	0,6	см
pH 6-ТВР 40°C	297,1	1393	151	1841, 1	16,1 37	75,6 61	8,202	0,87 6	скорость потока	0,5	мл/мин
pH 4 40°C	22,7	1844,5	245,3	2112, 5	1,07 5	87,3 14	11,61	1,00 5	Иньект. об.	0,02 0	мл
pH 8 40°C	22,5	1656,8	210	1889, 3	1,19 1	87,6 94	11,11	0,89 9			
pH 3 3 ч 25°C	15,2	1425,4	56,3	1496, 9	1,01 5	95,2 23	3,761	0,71 2			
pH 6,0 -80 F/T 5x	21,8	1918,7	16,9	1957, 4	1,11 4	98,0 23	0,863	0,93 1			
pH 6,0 RT встряхива ние	6,8	1346,3	11,4	1364, 5	0,49 8	98,6 66	0,835	0,64 9			

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или управления течением аутоиммунного расстройства, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении или управлении течением, мультиспецифического антитела, где мультиспецифическое антитело связывается с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) и антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки.

2. Способ по п. 1, где аутоиммунное расстройство представляет собой ассоциированный с антителом к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулит (AAV), ревматоидный артрит (RA) или системную красную волчанку (SLE).

3. Способ лечения или управления течением ассоциированного с антителом к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулита (AAV), включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении или управления течением, мультиспецифического антитела, где мультиспецифическое антитело связывается с BCMA и с антигеном, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, выбран из группы, состоящей из CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR ζ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2 или CD226, предпочтительно, где антиген, который способствует активации одной или более чем одной Т-клетки, представляет собой CD3.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с BCMA и CD3.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, возможно где биспецифическое антитело представляет собой трехвалентное биспецифическое антитело, включающее два Fab-фрагмента антитела против BCMA, один Fab-фрагмент антитела против CD3 и один Fc-фрагмент, причем биспецифическое антитело представлено в формате Fab-фрагмент BCMA - Fc – Fab-фрагмент CD3 – Fab-фрагмент BCMA.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где мультиспецифическое антитело включает антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR3H CDR1L, CDR2L и CDR3L, выбранных из:

(а) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:27, области CDR2L с SEQ ID NO:28 и области CDR3L с SEQ ID NO:20;

(б) области CDR1H с SEQ ID NO:21, области CDR2H с SEQ ID NO:22, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:25, области CDR2L с SEQ ID NO:26 и области CDR3L с SEQ ID NO:20; или

(в) области CDR1H с SEQ ID NO:15, области CDR2H с SEQ ID NO:16, области CDR3H с SEQ ID NO:17, области CDR1L с SEQ ID NO:18, области CDR2L с SEQ ID NO:19 и области CDR3L с SEQ ID NO:20.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где мультиспецифическое антитело включает:

(а) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее(ий) переменную область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и переменную область VL, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14;

(б) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее(ий) переменную область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и переменную область VL, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13; или

(в) антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее(ий) переменную область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и переменную область VL, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где мультиспецифическое антитело включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) включает CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

10. Способ по п. 9, где антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, и переменную область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

11. Способ по любому из пп. 1-3, где мультиспецифическое антитело содержит совокупность тяжелой и легкой цепей, состоящую из полипептидов:

(а) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 и две копии SEQ ID NO:57;

(б) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59 и две копии SEQ ID NO:60;

или

(в) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62 и две копии SEQ ID NO:63.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, IgA-нефропатии, мембранозной нефропатии, миастении гравис, нейромиеелита зрительного нерва, обыкновенной пузырчатки, ревматоидного артрита, активируемого антителами против PAD4, сенсibilизированными/преформированными антителами в трансплантате паренхиматозного органа, синдрома Гийена-Барре (острой воспалительной демиелинизирующей полиневропатии – AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIDP), иммунной тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита и васкулита, ассоциированного с ANCA (AAV).

13. Способ по любому из пп. 3-12, где AAV включает заболевания, которые выбраны из группы, состоящей из гранулематоза с полиангиитом (GPA),

эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), микроскопического полиангиита (MPA) и васкулита с поражением почек, ассоциированного с ANCA.

14. Способ по п. 13, где AAV представляет собой гранулематоз с полиангиитом (GPA).

15. Способ по п. 13, где AAV представляет собой эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (EGPA).

16. Способ по п. 13, где AAV представляет собой микроскопический полиангиит (MPA).

17. Способ по п. 13, где AAV представляет собой васкулит с поражением почек, ассоциированный с ANCA.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где аутоиммунное расстройство (например AAV) устойчиво к лечению или является рецидивирующим.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где аутоиммунное расстройство (например AAV) является впервые диагностированным.

20. Способ по любому из пп. 3-16, 18 или 19, где AAV поражает одну или более чем одну часть организма пациента, выбранную из нервной системы, глаз, носа, сердца, почек, желудка, кишечника, легких, суставов, мышц и кожи.

21. Способ по любому из пп. 3-20, где AAV является генерализованным, с наличием проявлений, угрожающих жизни или основным органам.

22. Способ по п. 21, где пациент страдает от диффузного альвеолярного кровотечения (ДАН).

23. Способ по любому из пп. 3-20, где AAV является локализованным, без проявлений, угрожающих органам.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где пациент нуждается в уменьшении уровня плазмобластов.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где пациент имеет риск развития синдрома высвобождения цитокинов.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где пациент имеет риск развития инфекции.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где пациент нуждается в индукции ремиссии.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где пациент нуждается в поддержании ремиссии.

29. Способ по любому из пп. 1-28, который приводит к уменьшению плазмабластов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с отсутствием лечения или контрольным лечением.

30. Способ по любому из пп. 1-29, который приводит к уменьшению частоты возникновения синдрома высвобождения цитокинов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

31. Способ по любому из пп. 1-30, который приводит к уменьшению частоты возникновения инфекции у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

32. Способ по любому из пп. 1-31, который приводит к ускорению индукции ремиссии у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

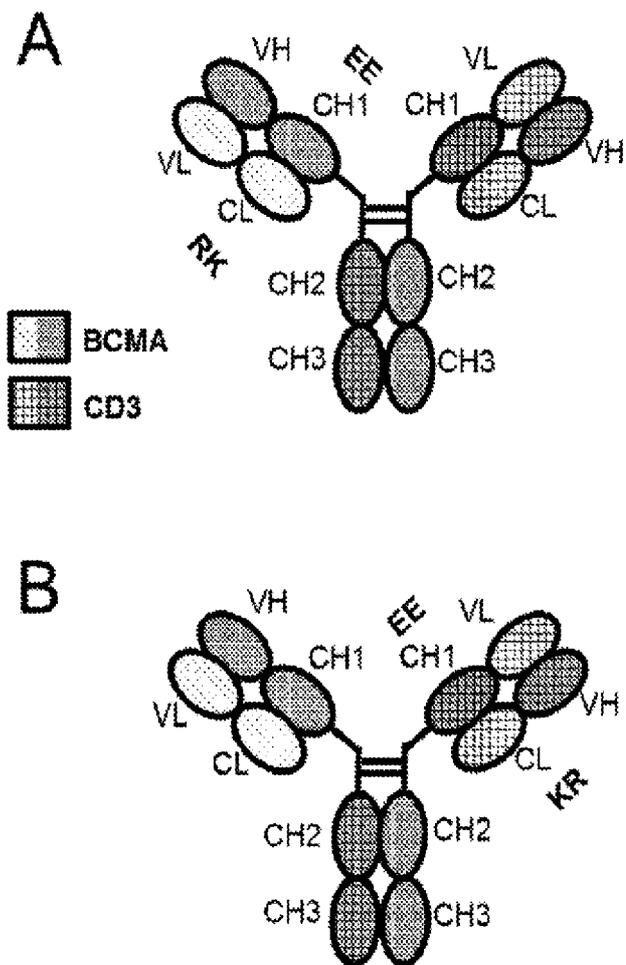
33. Способ по любому из пп. 1-32, который приводит к более длительному поддержанию ремиссии у пациента, по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95% или 100% по сравнению с контрольным лечением.

34. Способ по любому из пп. 29-33, где контрольное лечение представляет собой лечение стероидами (например глюкокортикоидами), циклофосфамидом, моноклональным антителом против CD20 (например ритуксимабом), метотрексатом, азатиоприном, микофенолатом, микофенолата мофетиллом, авакопаном, агентами против TNF (фактора некроза опухоли) (например инфликсимабом, адалимумабом, голимумабом, этанерцептом), антителами против IL6R (рецептор интерлейкина 6) (например тоцилизумабом, сарилумабом), костимулирующими блокаторами (например абатацептом), ингибиторами JAK (янус-киназ) (например тофацитинибом, барицитинибом) и/или белимумабом, предпочтительно, где контрольное лечение представляет собой лечение стероидами, циклофосфамидом или ритуксимабом.

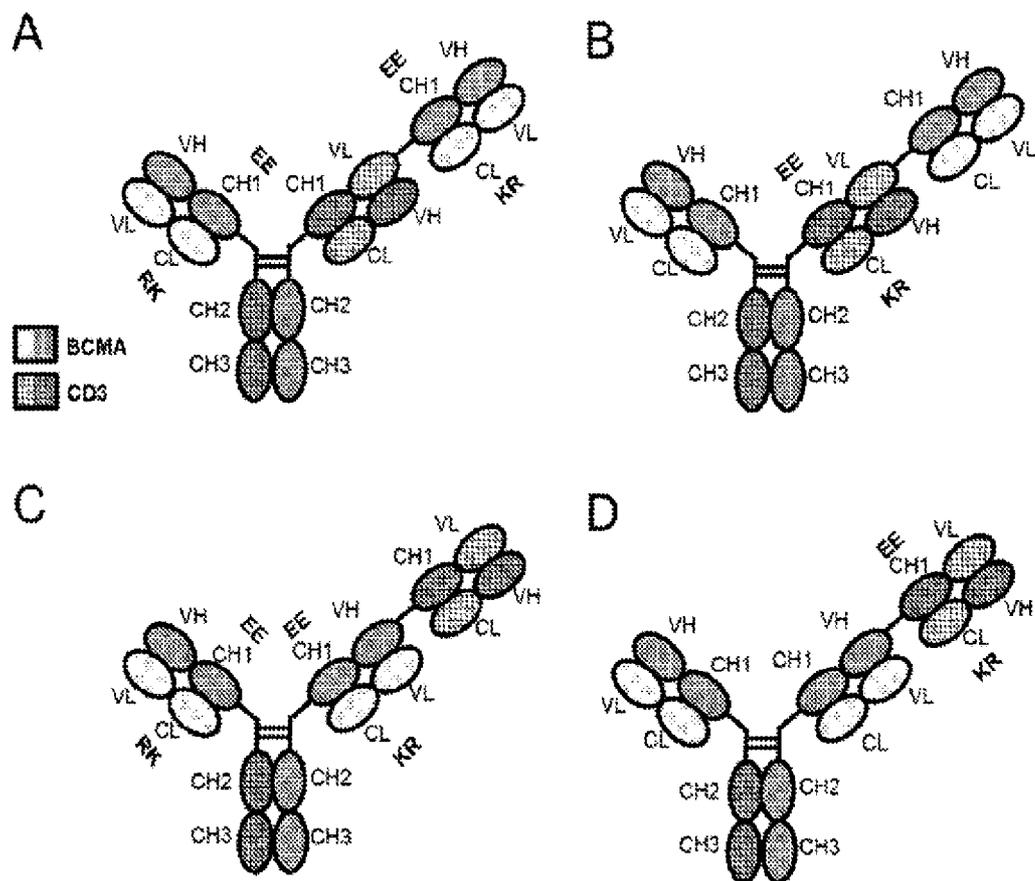
35. Способ по любому из пп. 1-34, который используют для индукции ремиссии.

36. Способ по любому из пп. 1-34, который используют для поддержания ремиссии.

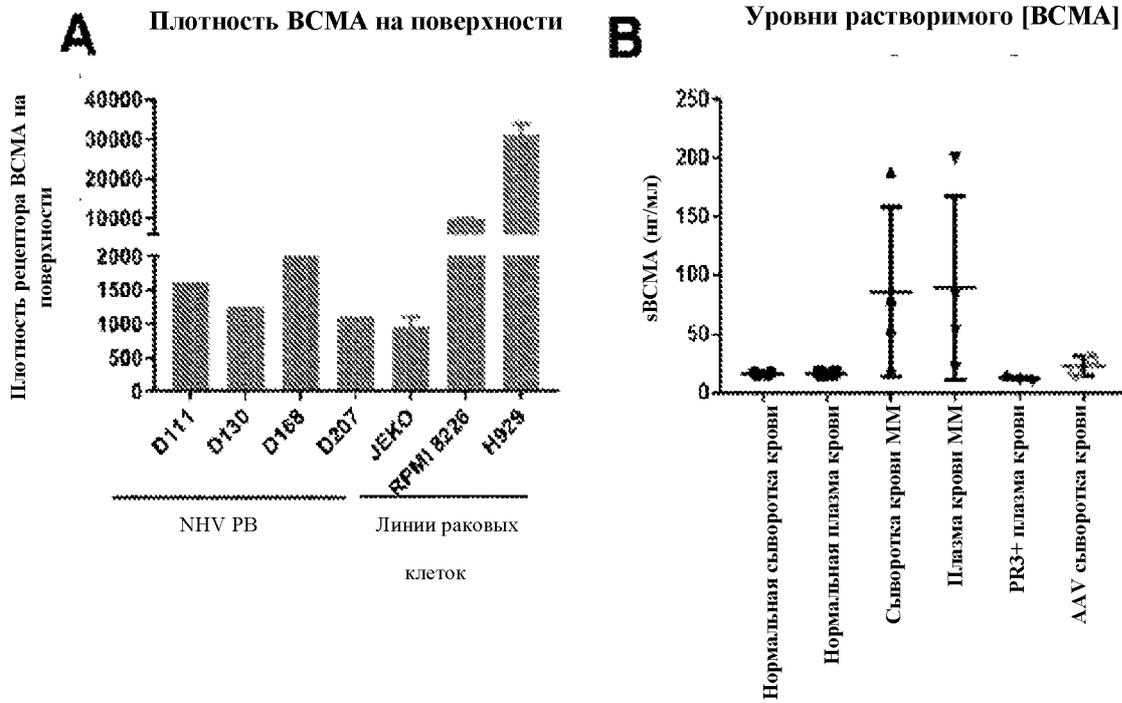
Фиг. 1



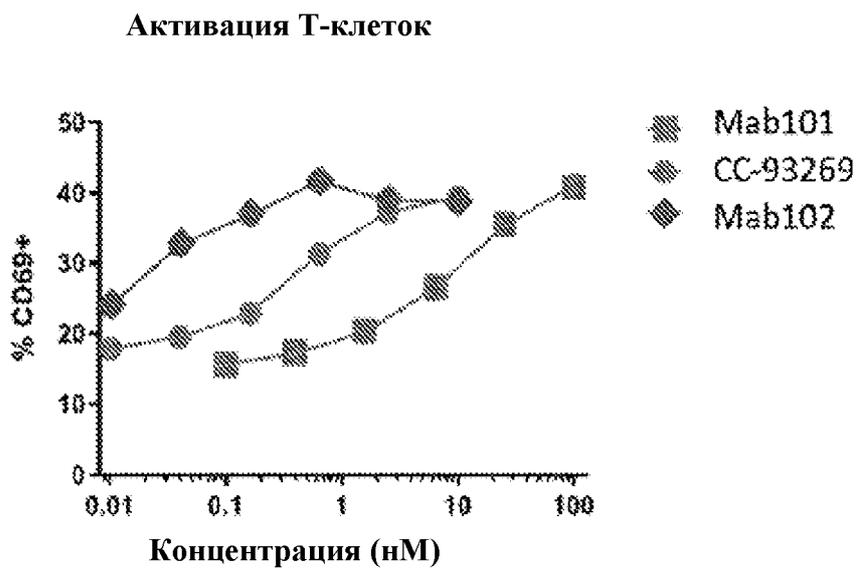
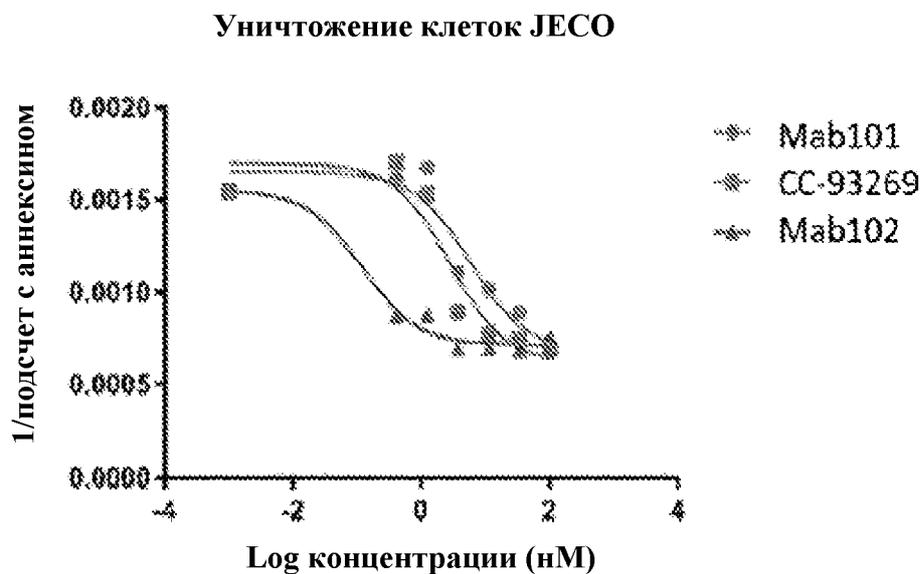
Фиг. 2

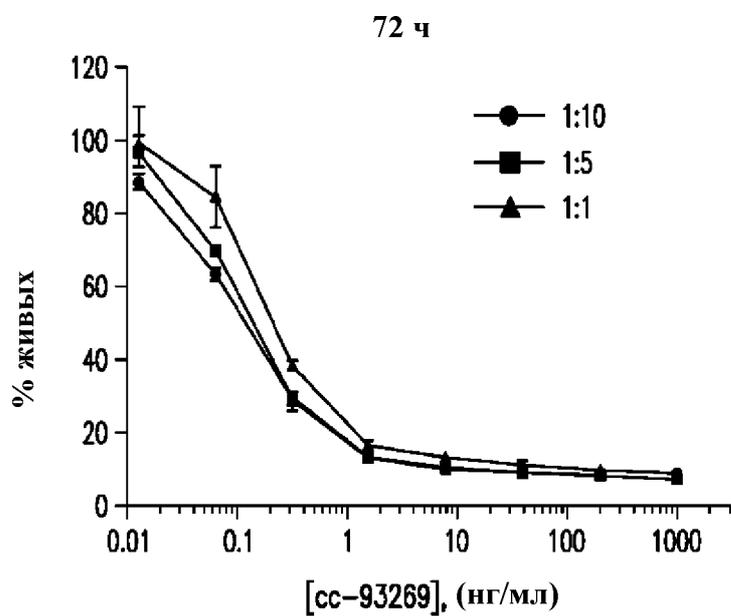
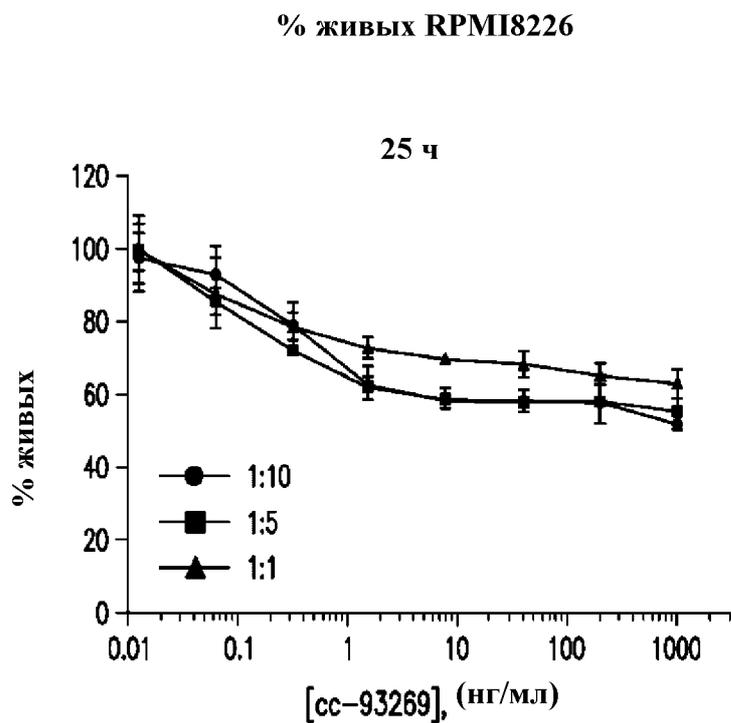


Фиг. 4

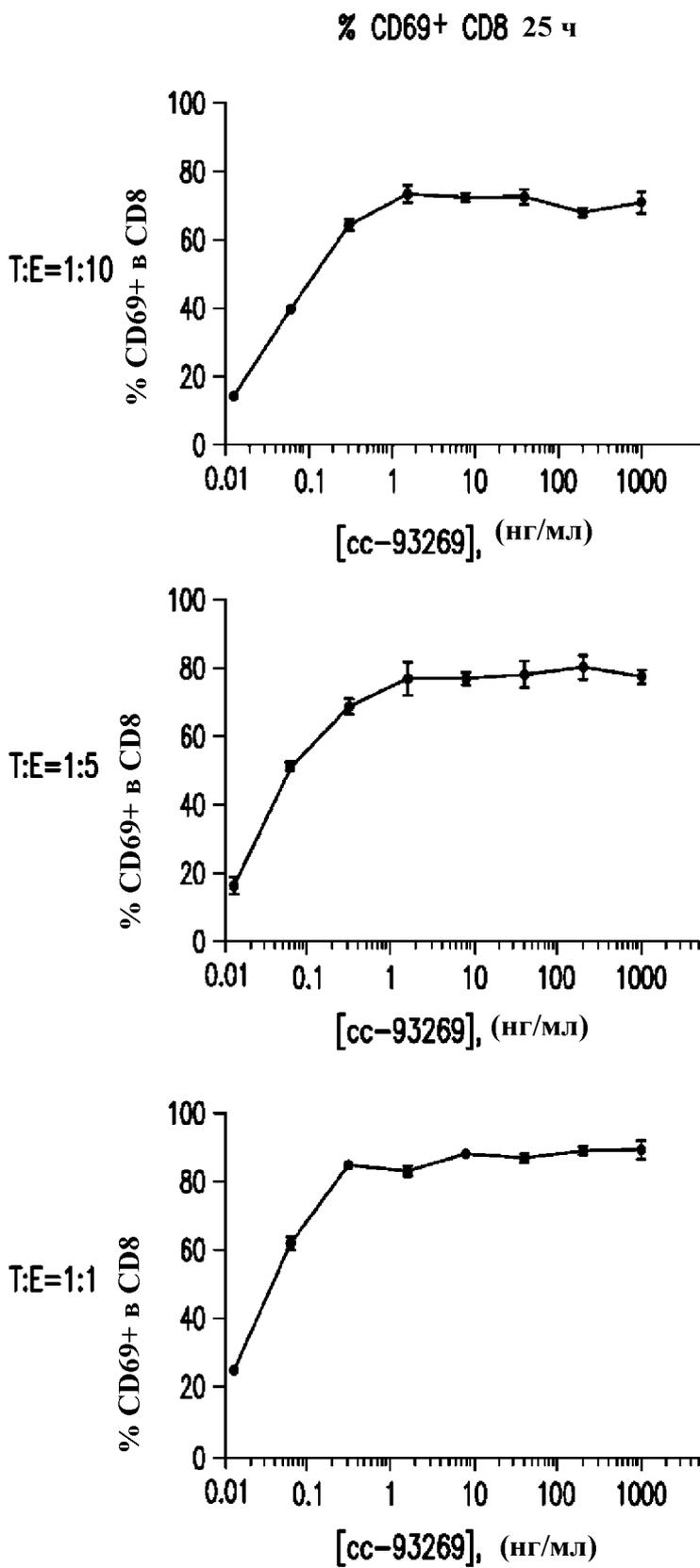


Фиг. 5



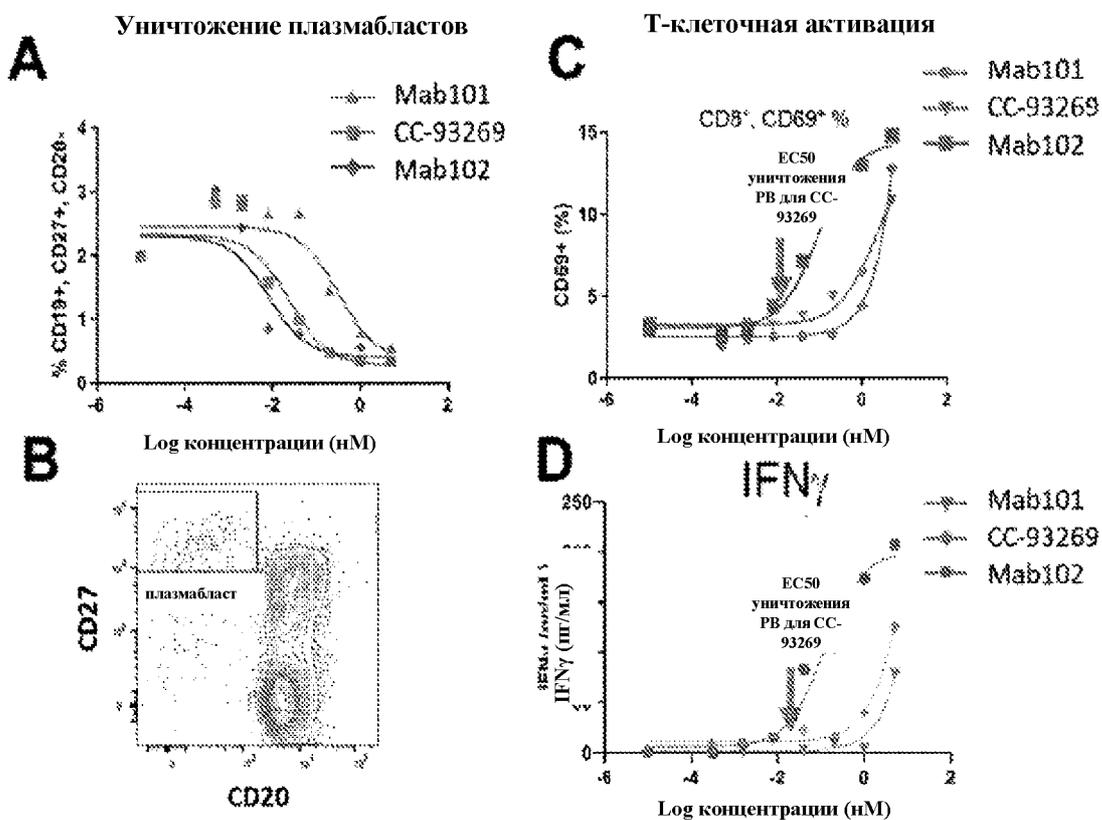


Фиг. 6А

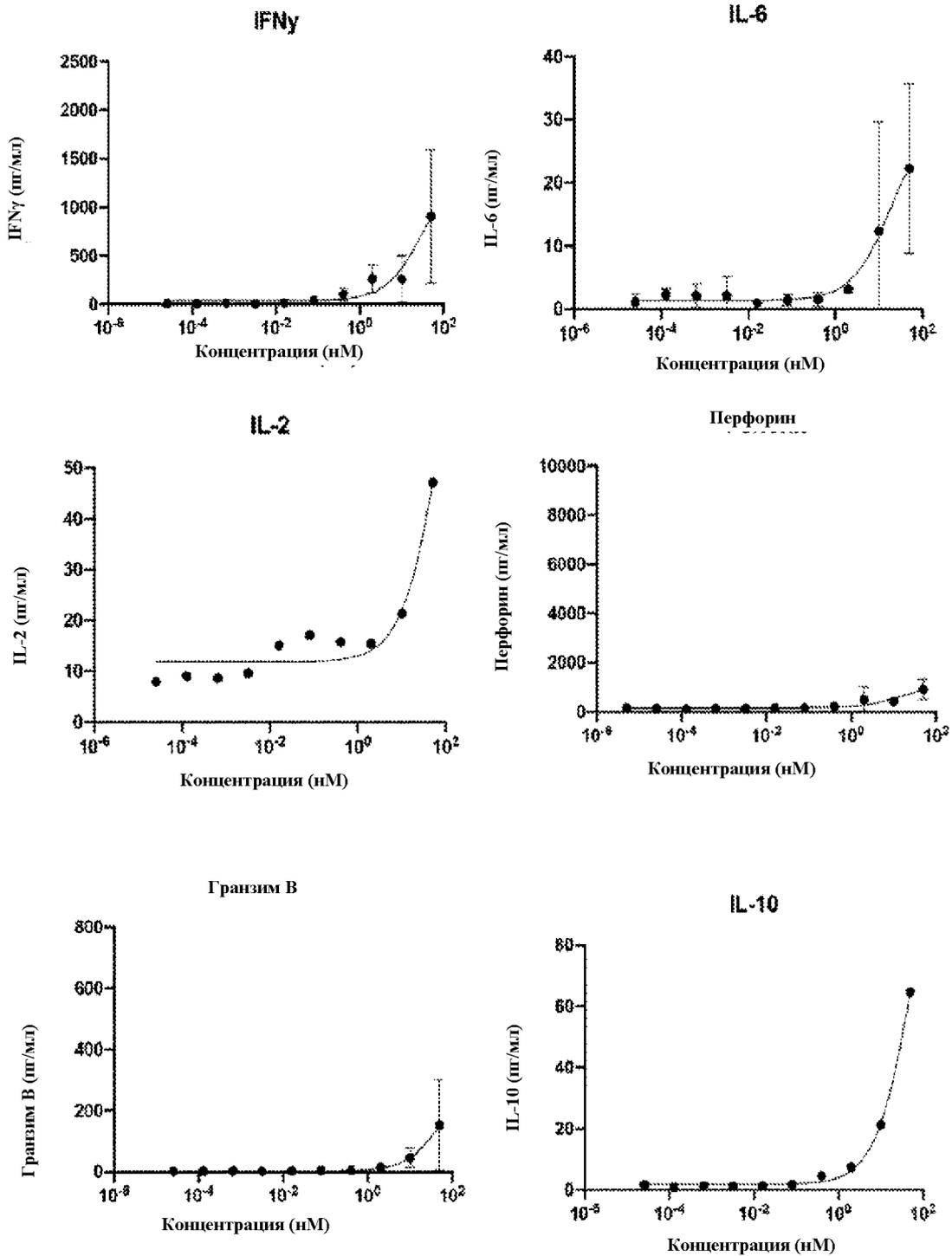


Фиг. 6В

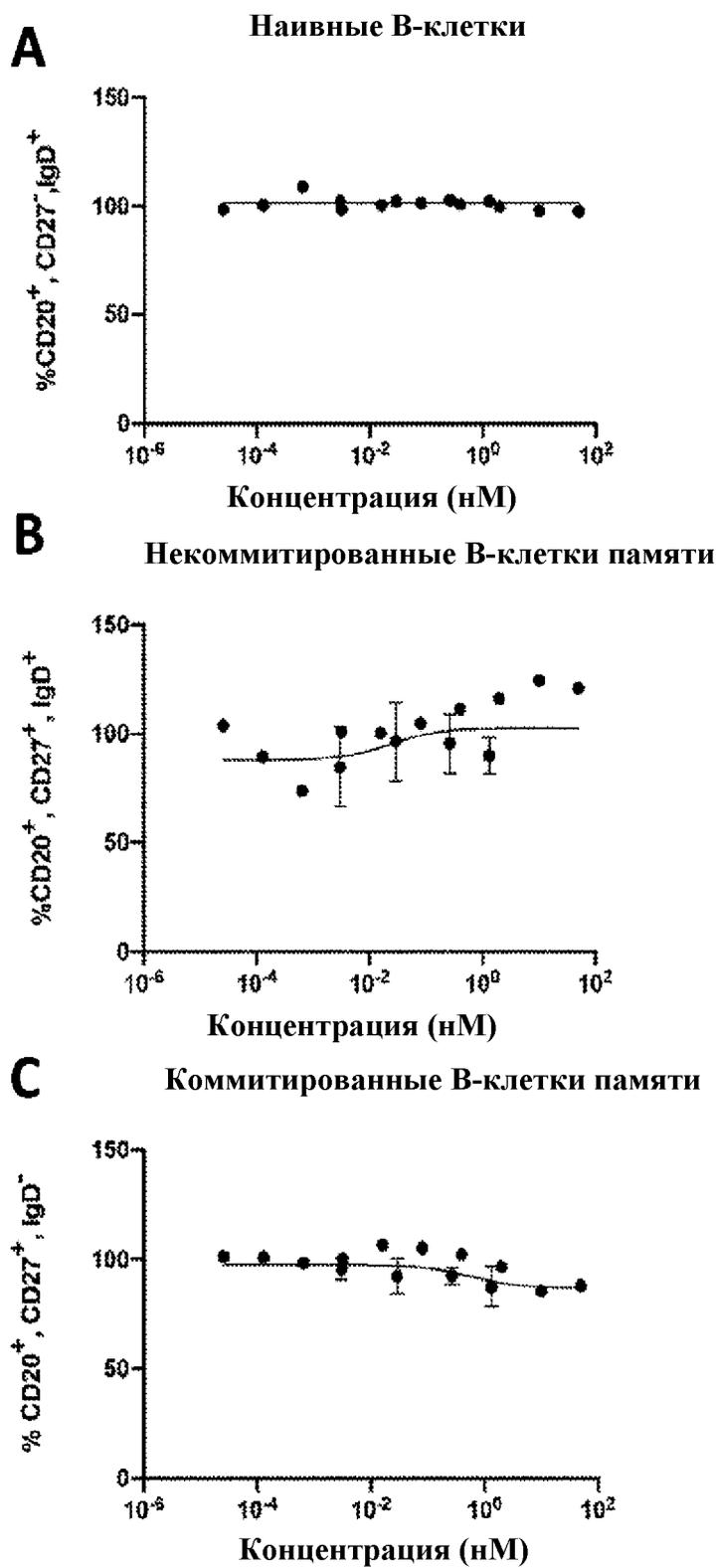
Фиг. 7



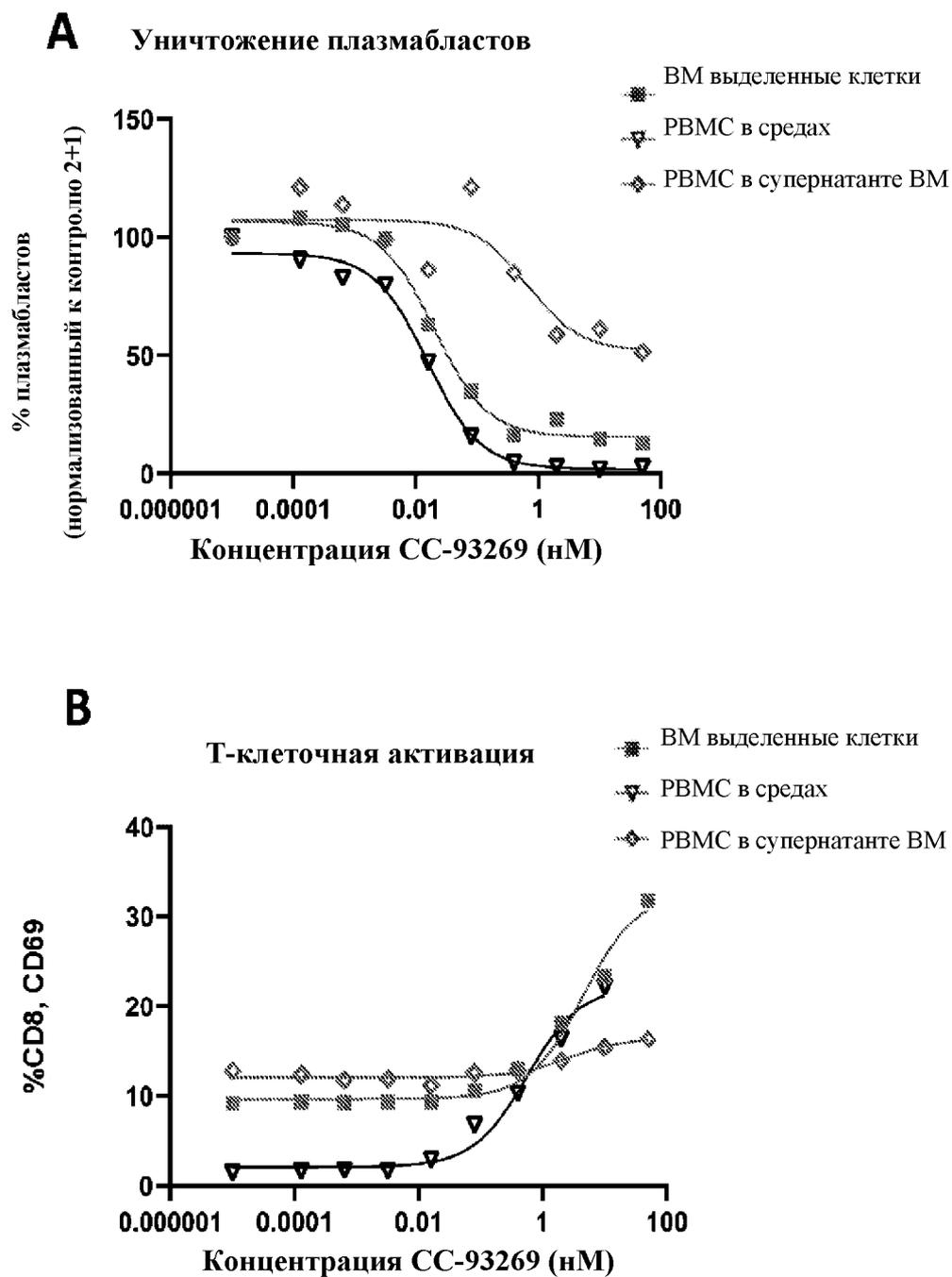
Фиг. 8

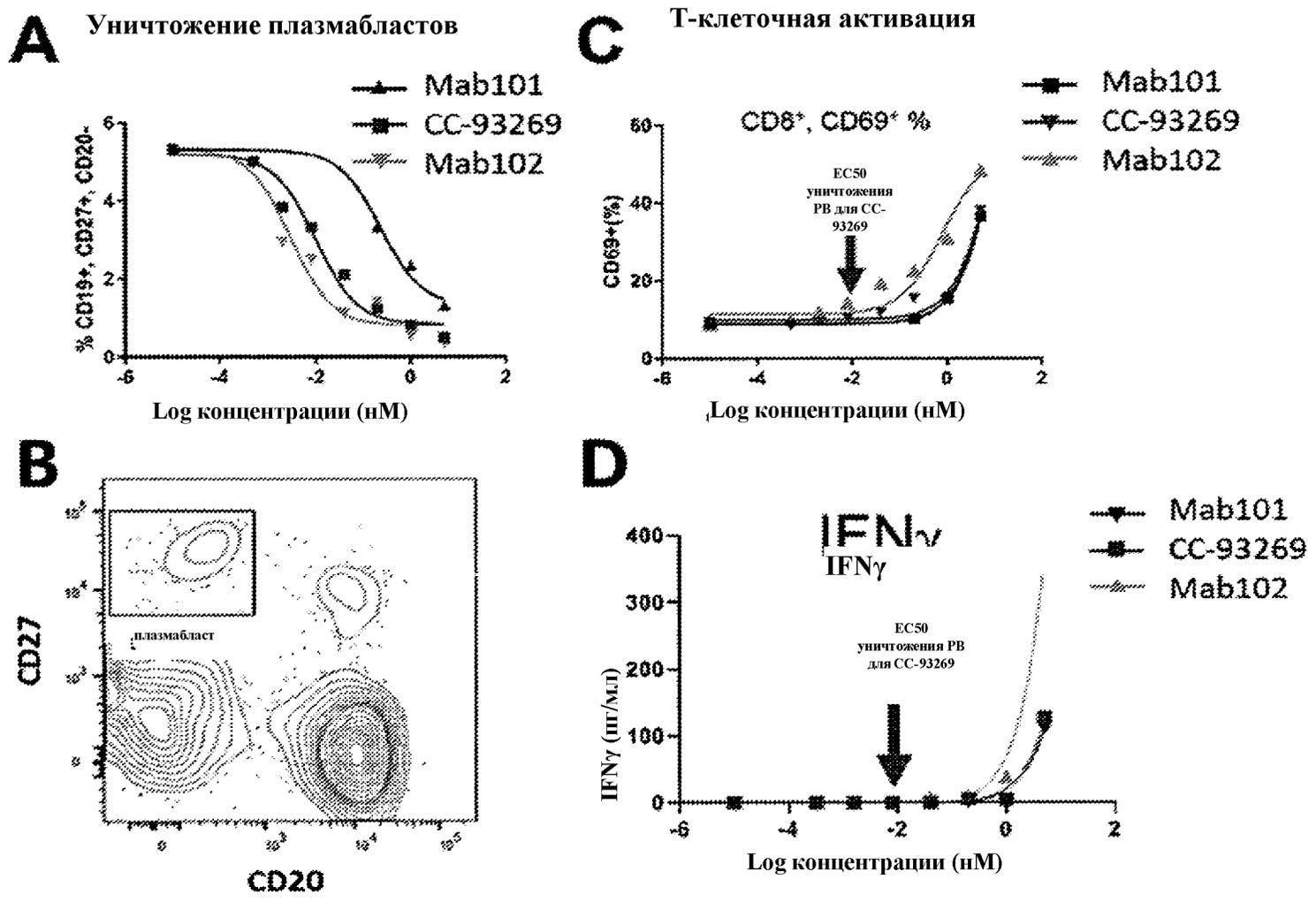


Фиг. 9



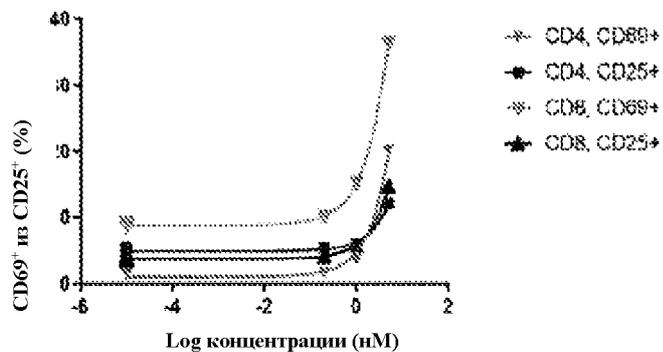
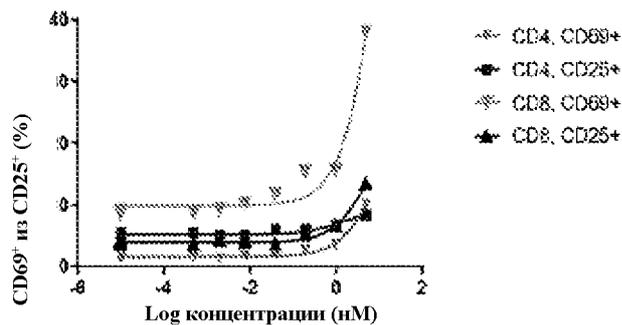
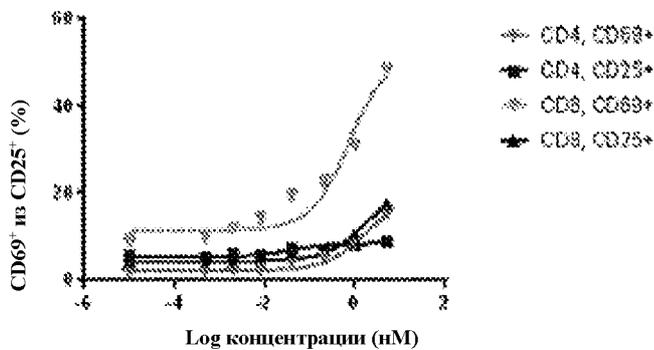
Фиг. 10

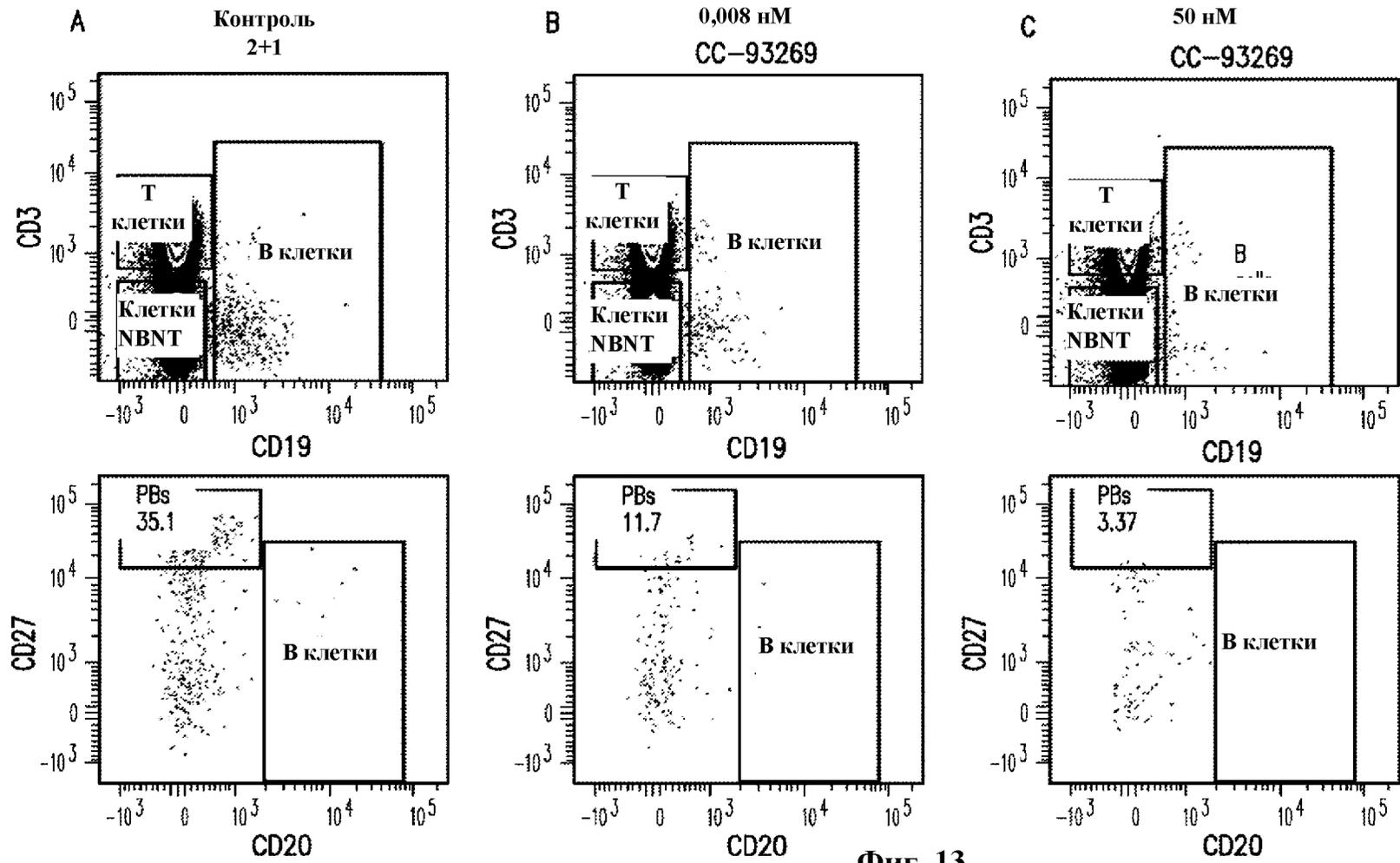




Фиг. 11

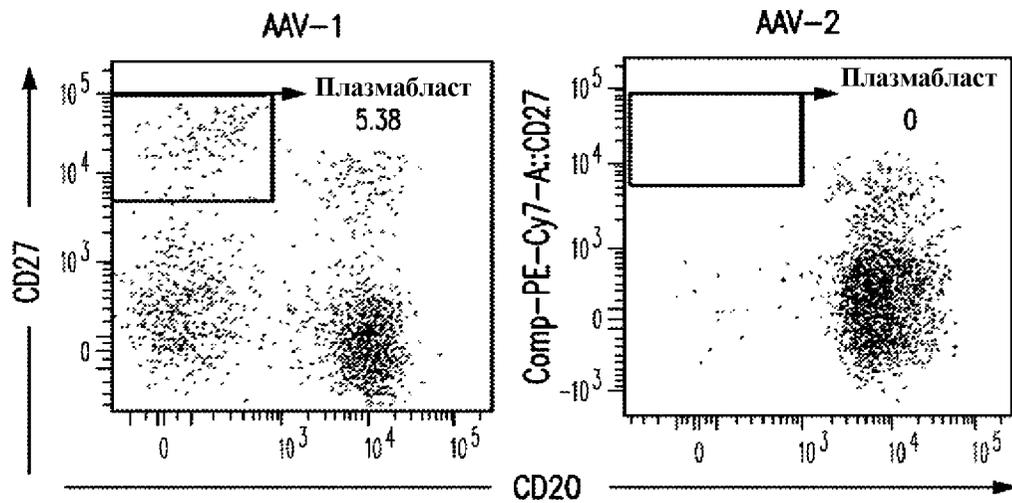
Фиг. 12

A**Т-Клеточная активация в AAV1 с Mab101****B****Т-Клеточная активация в AAV1 с СС-93269****C****Т-Клеточная активация в AAV1 с Mab102**



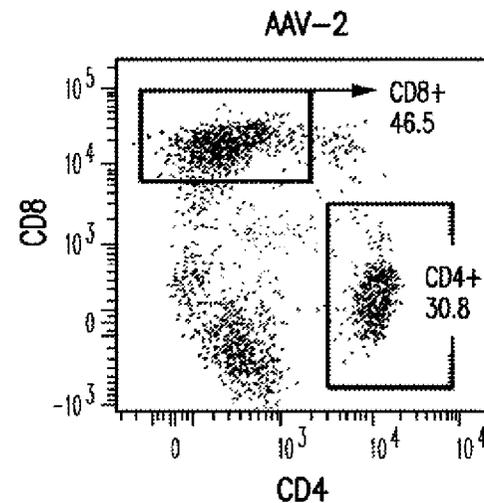
Фиг. 13

Базовый плазмабласт/Частота плазматических клеток

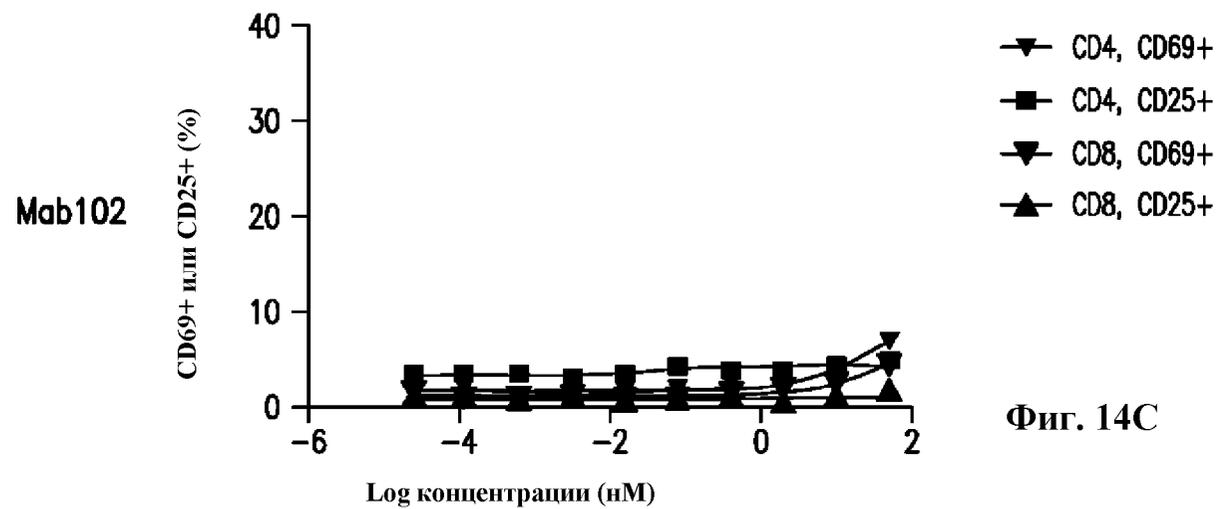
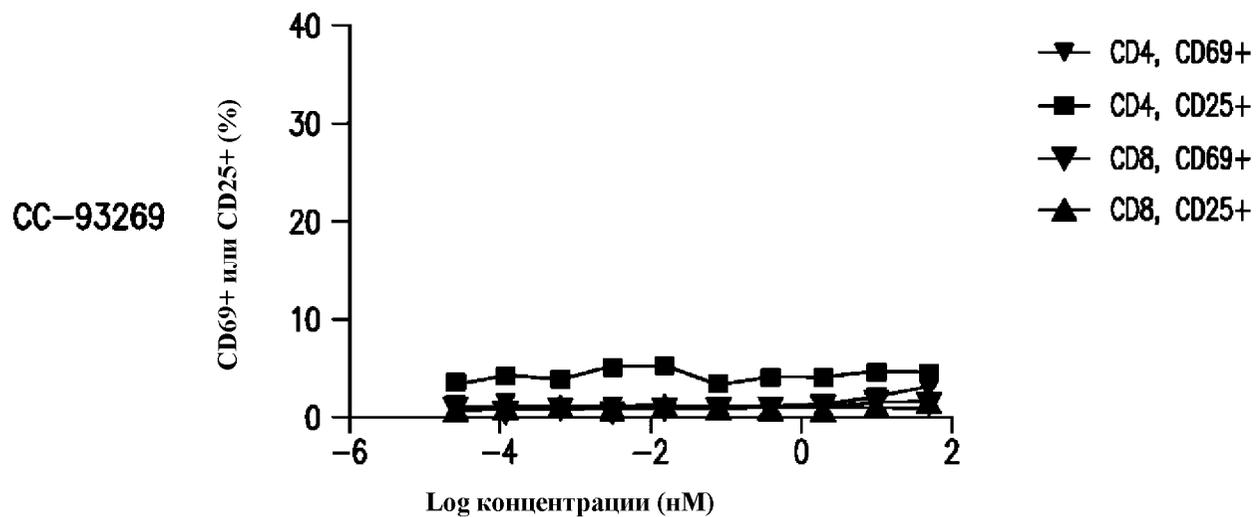


Фиг. 14А

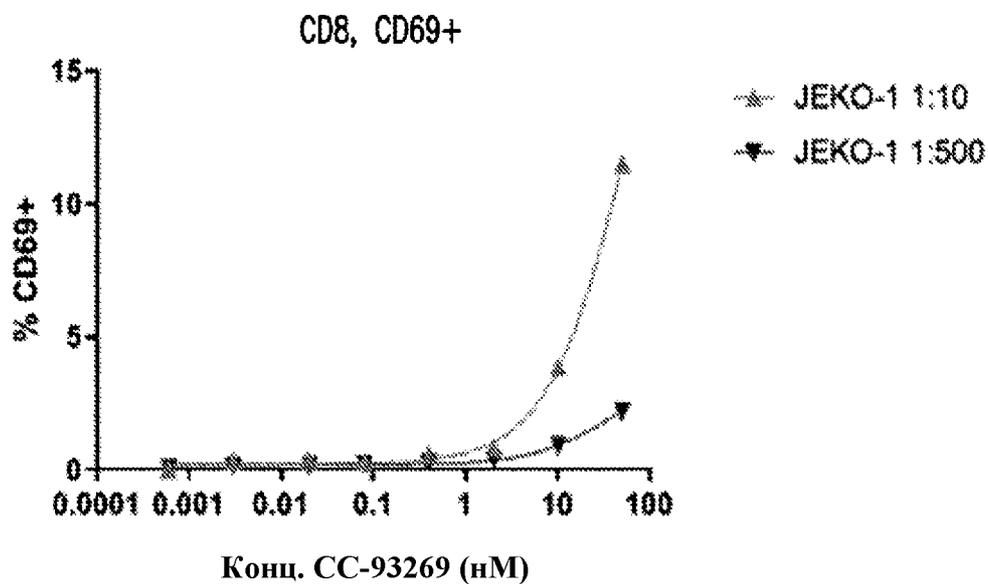
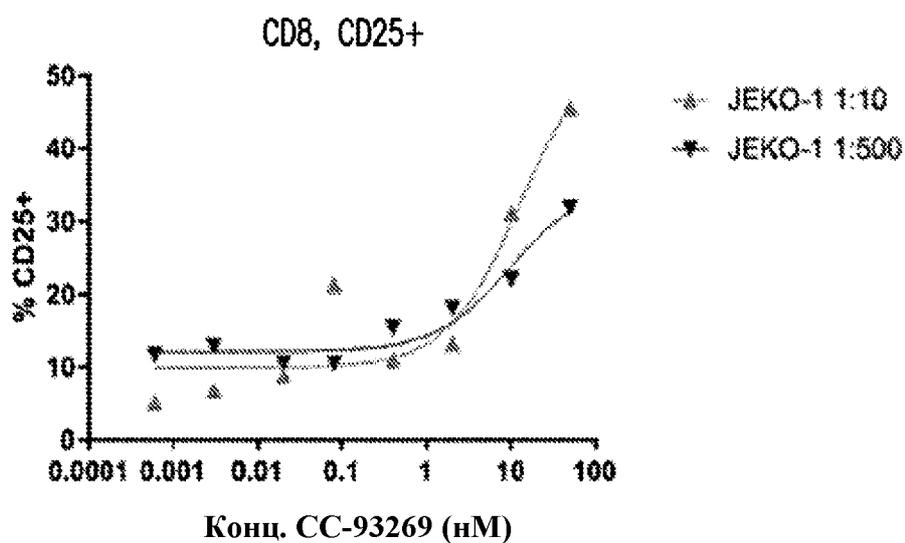
Базовый Т-клетки



Фиг. 14В

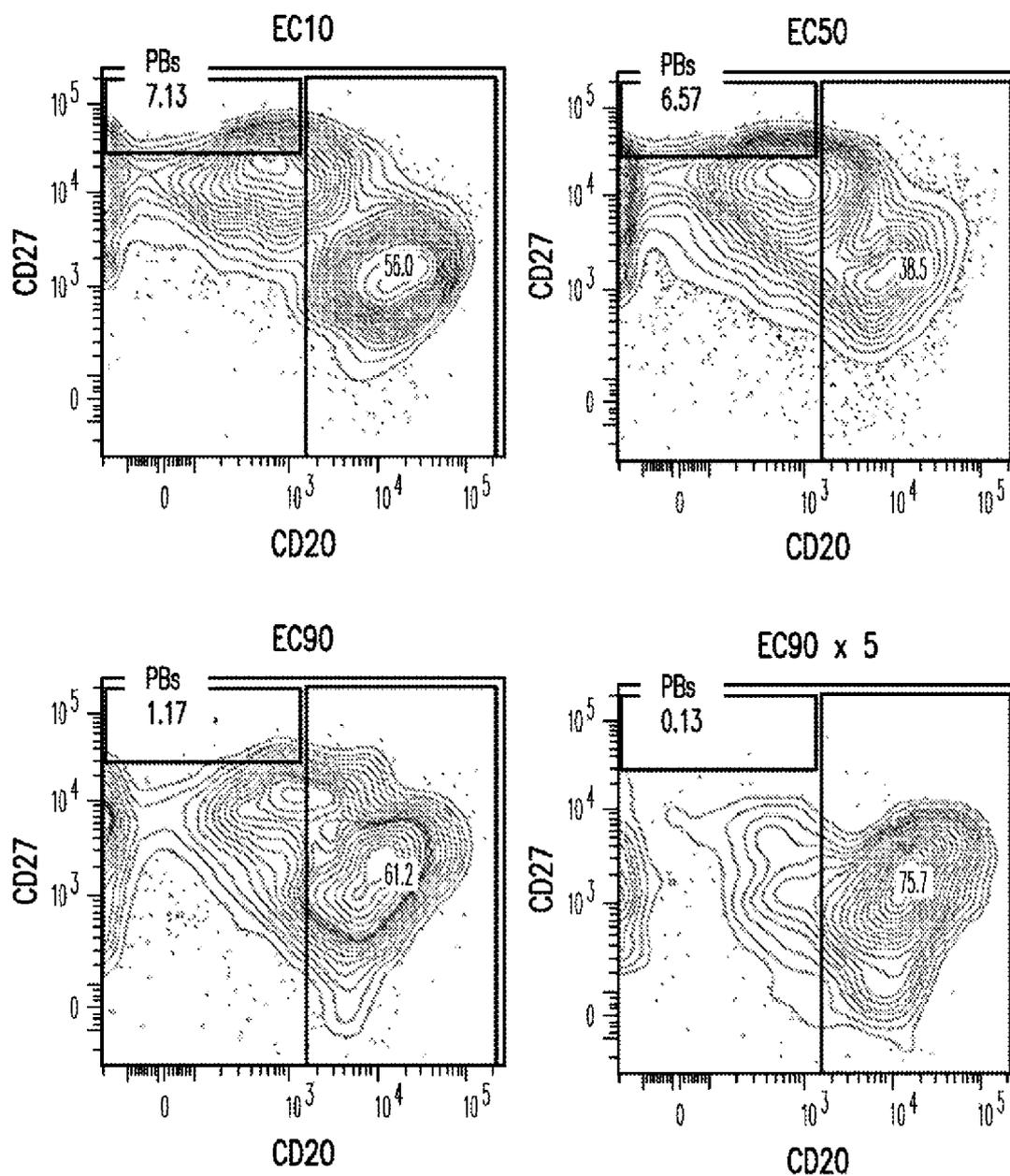


Фиг. 14С

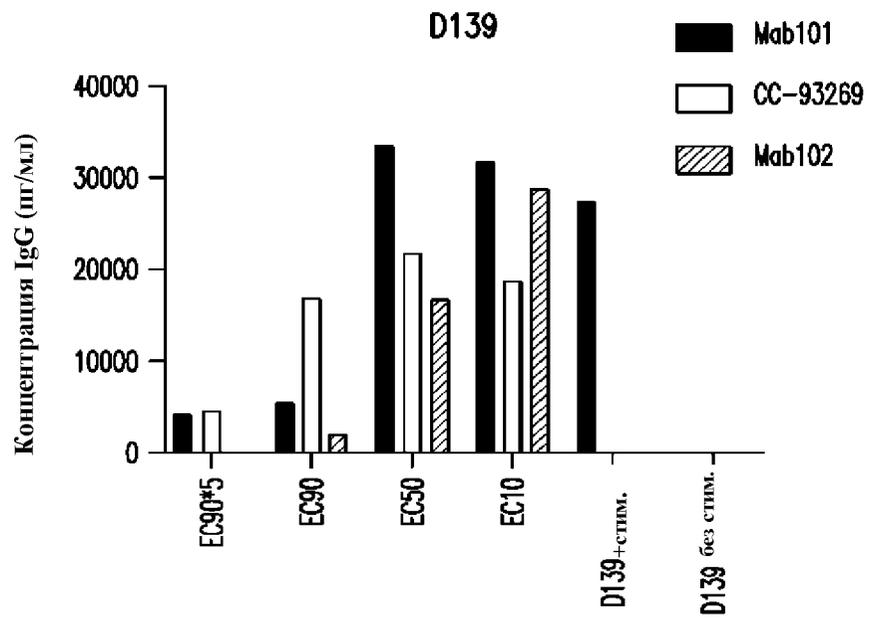
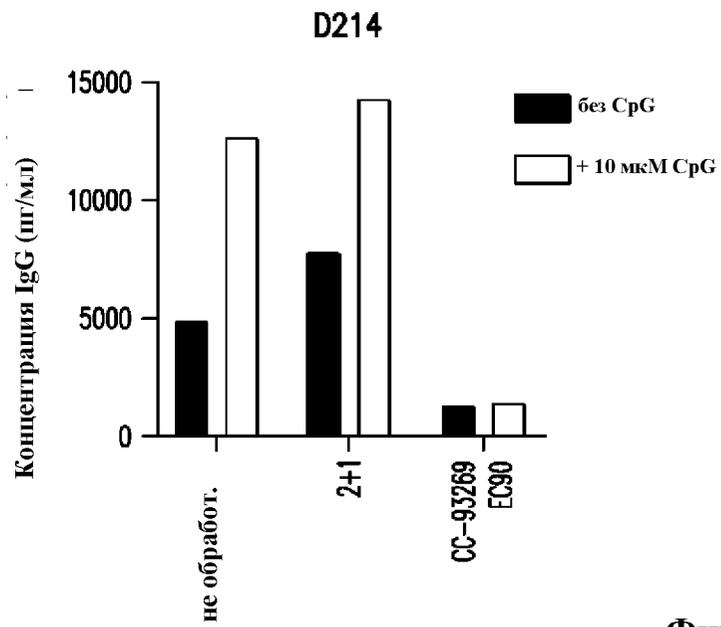
A**B**

Фиг. 15

Mab102



Фиг. 16А

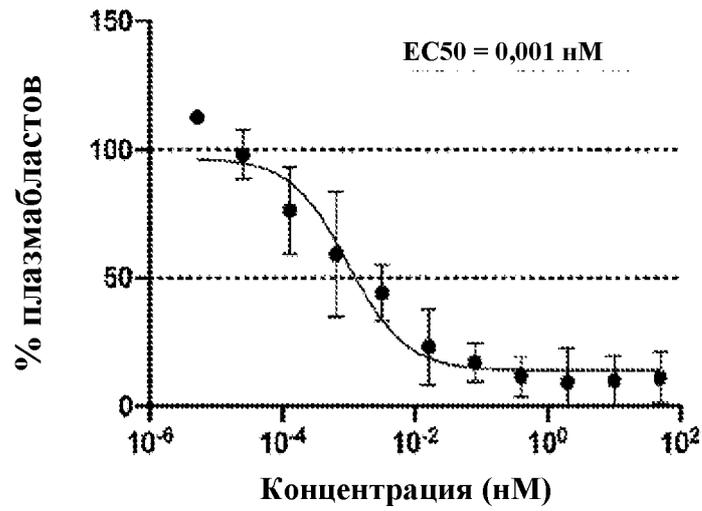


Фиг. 16В

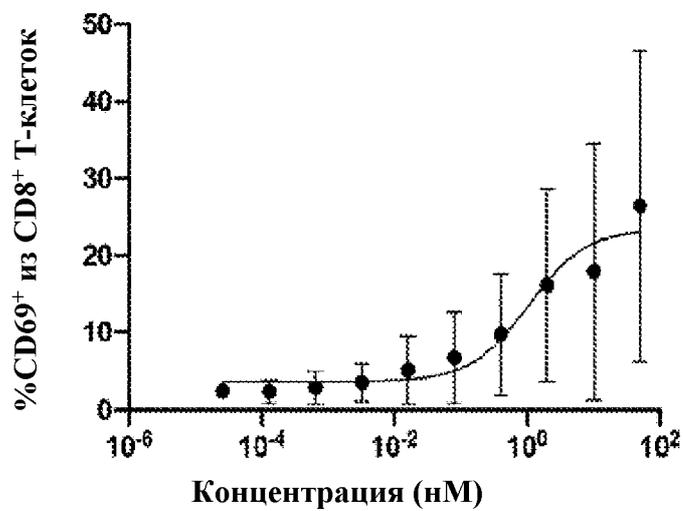
Фиг. 17

А

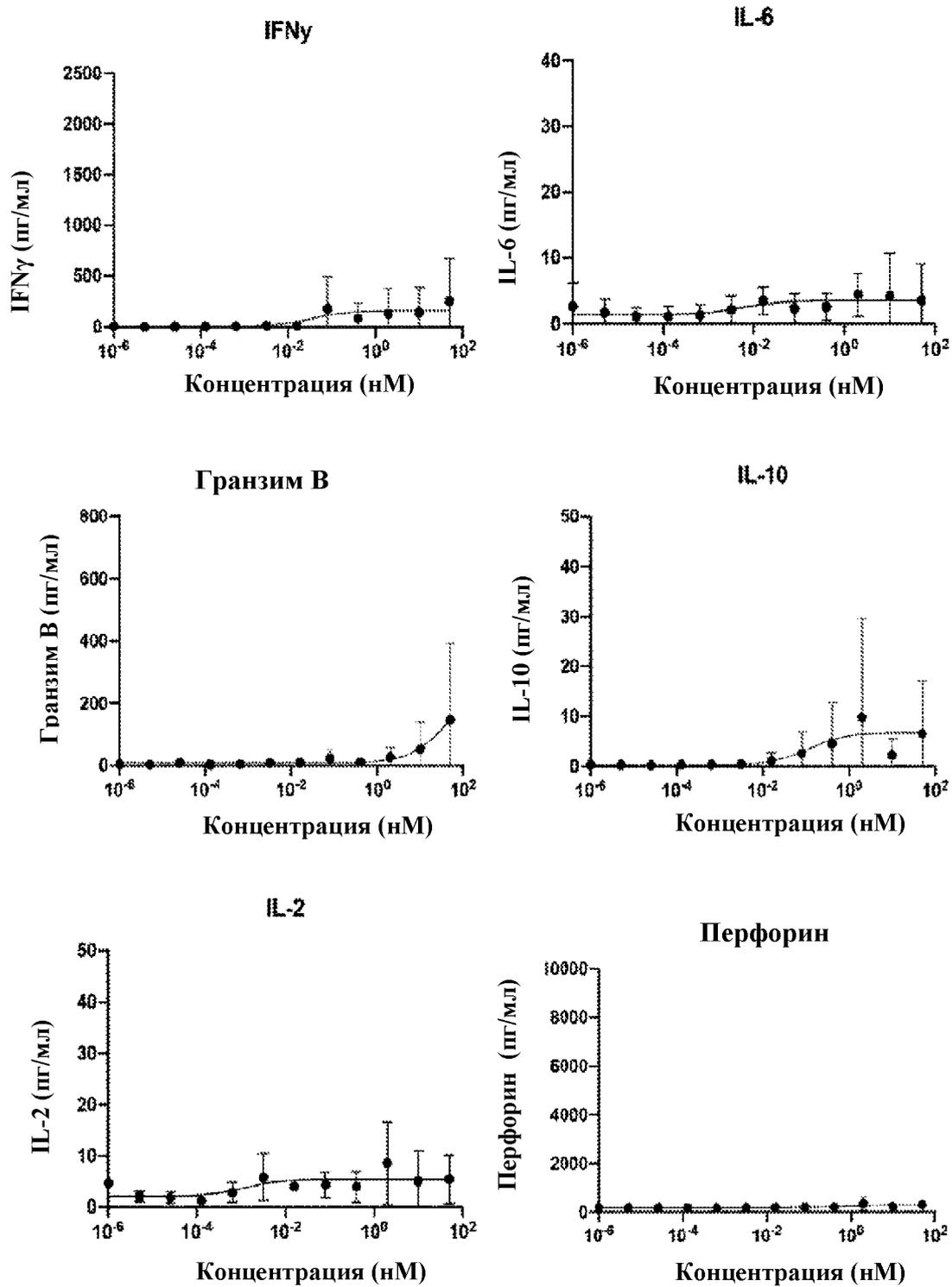
Уничтожение плазмбластов

**В**

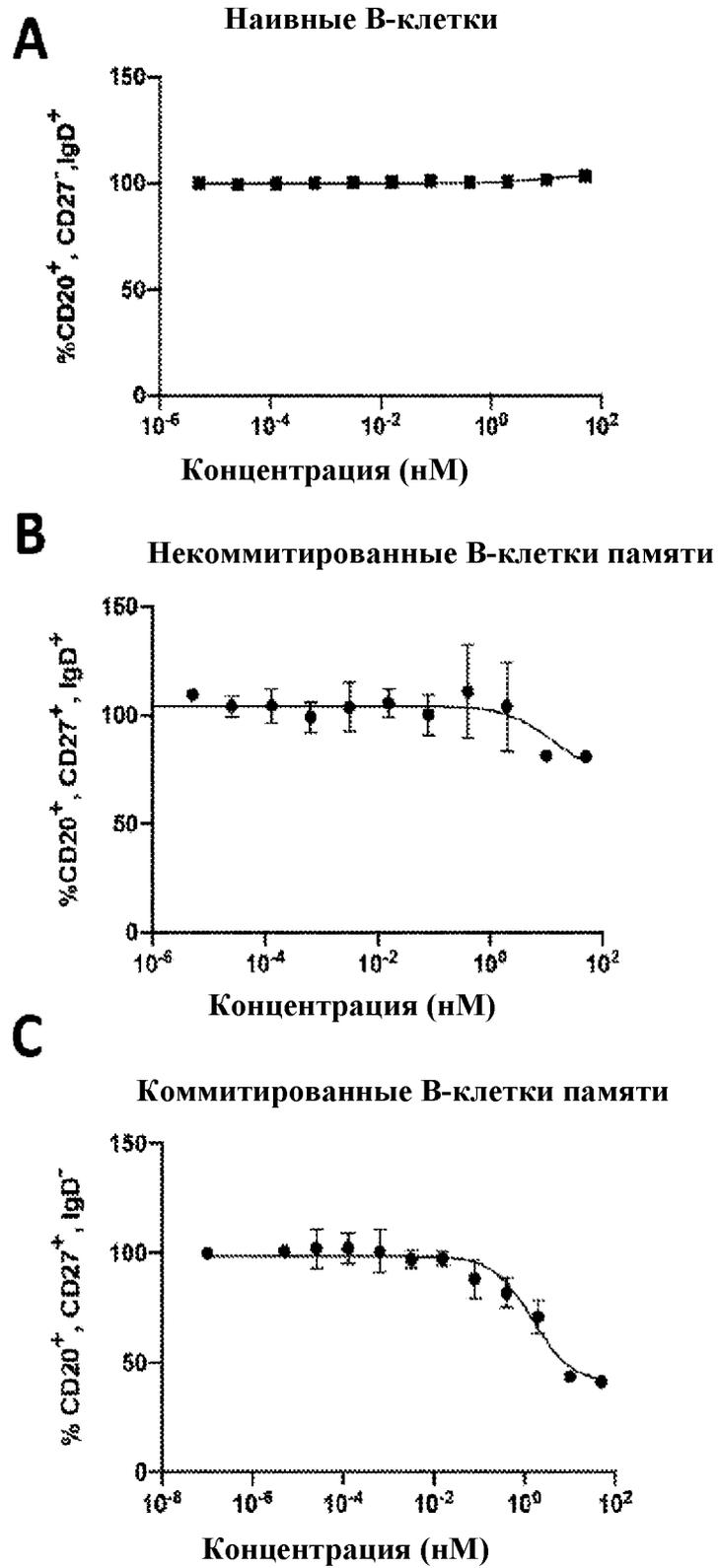
Т-клеточная активация



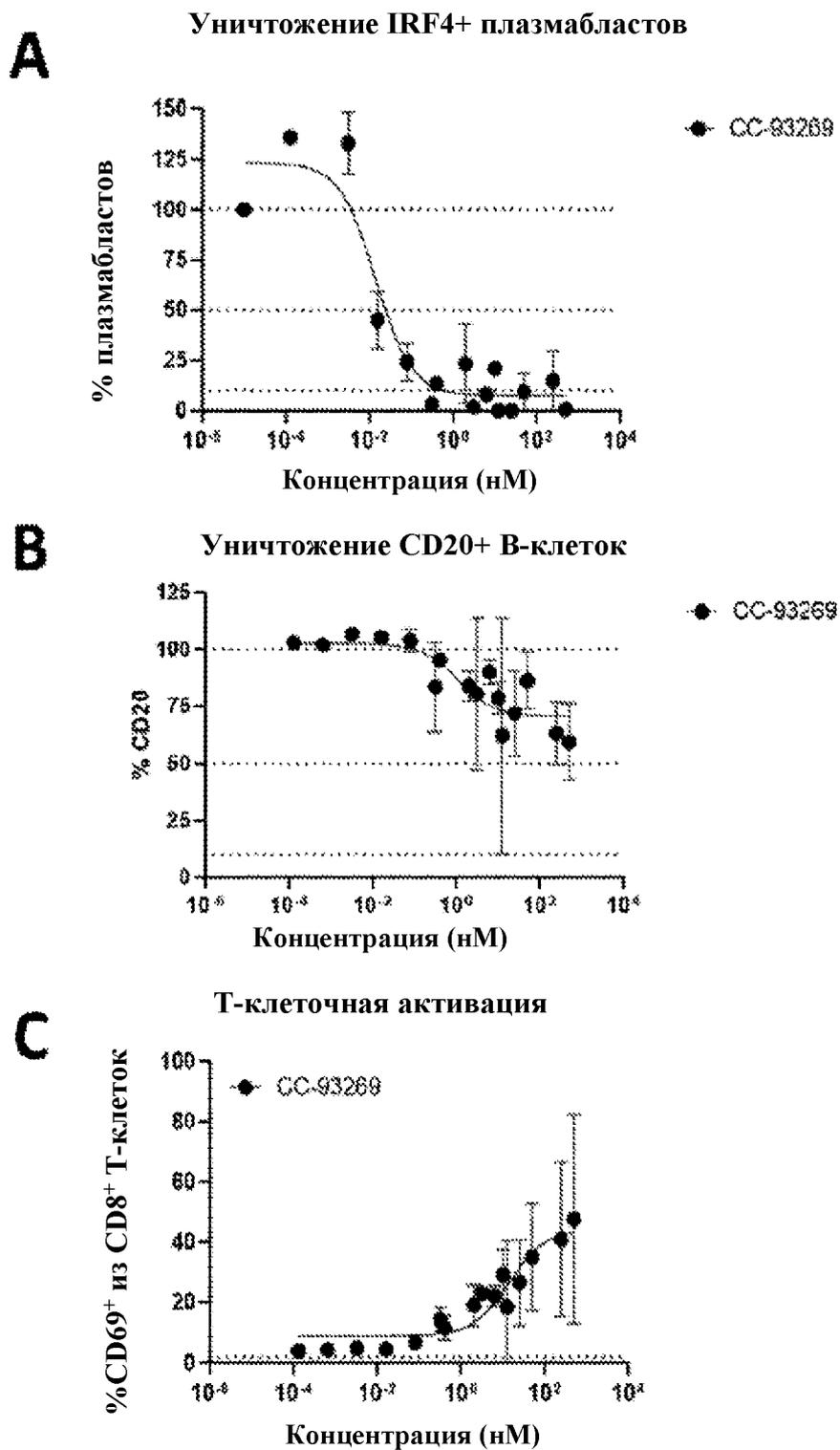
Фиг. 17С



Фиг. 18



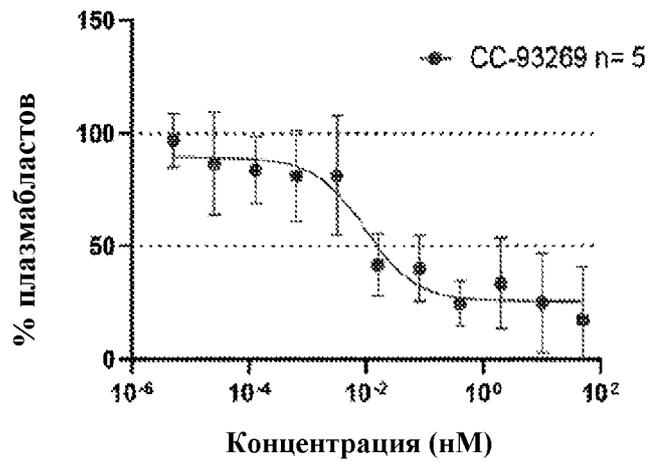
Фиг. 19



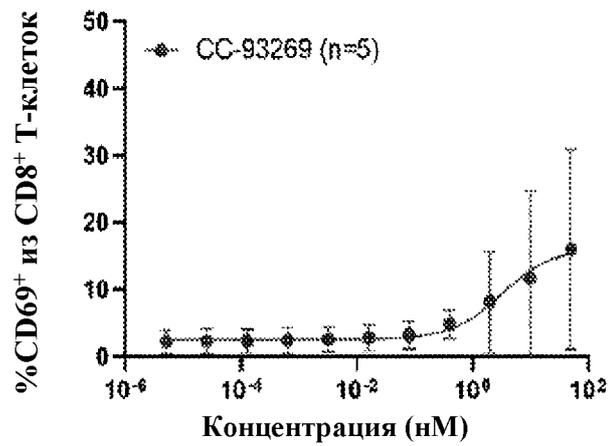
Фиг. 20

А

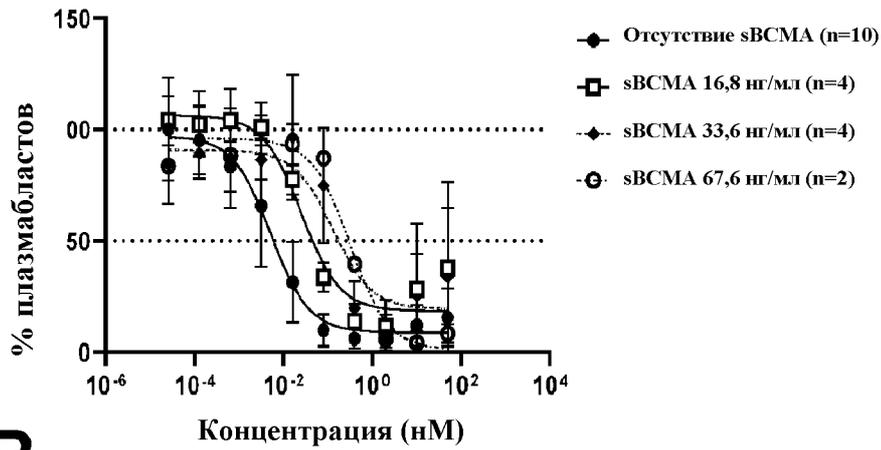
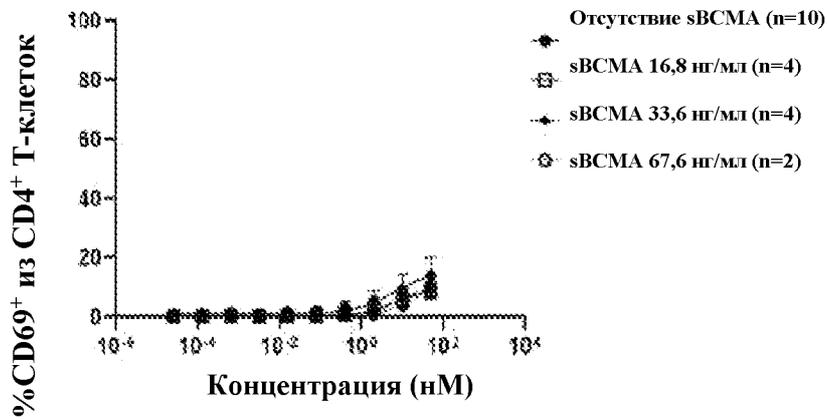
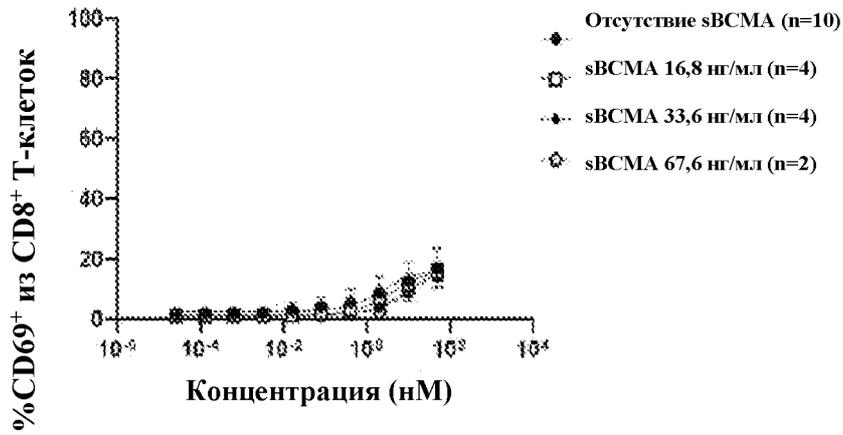
Уничтожение плазмбластов

**В**

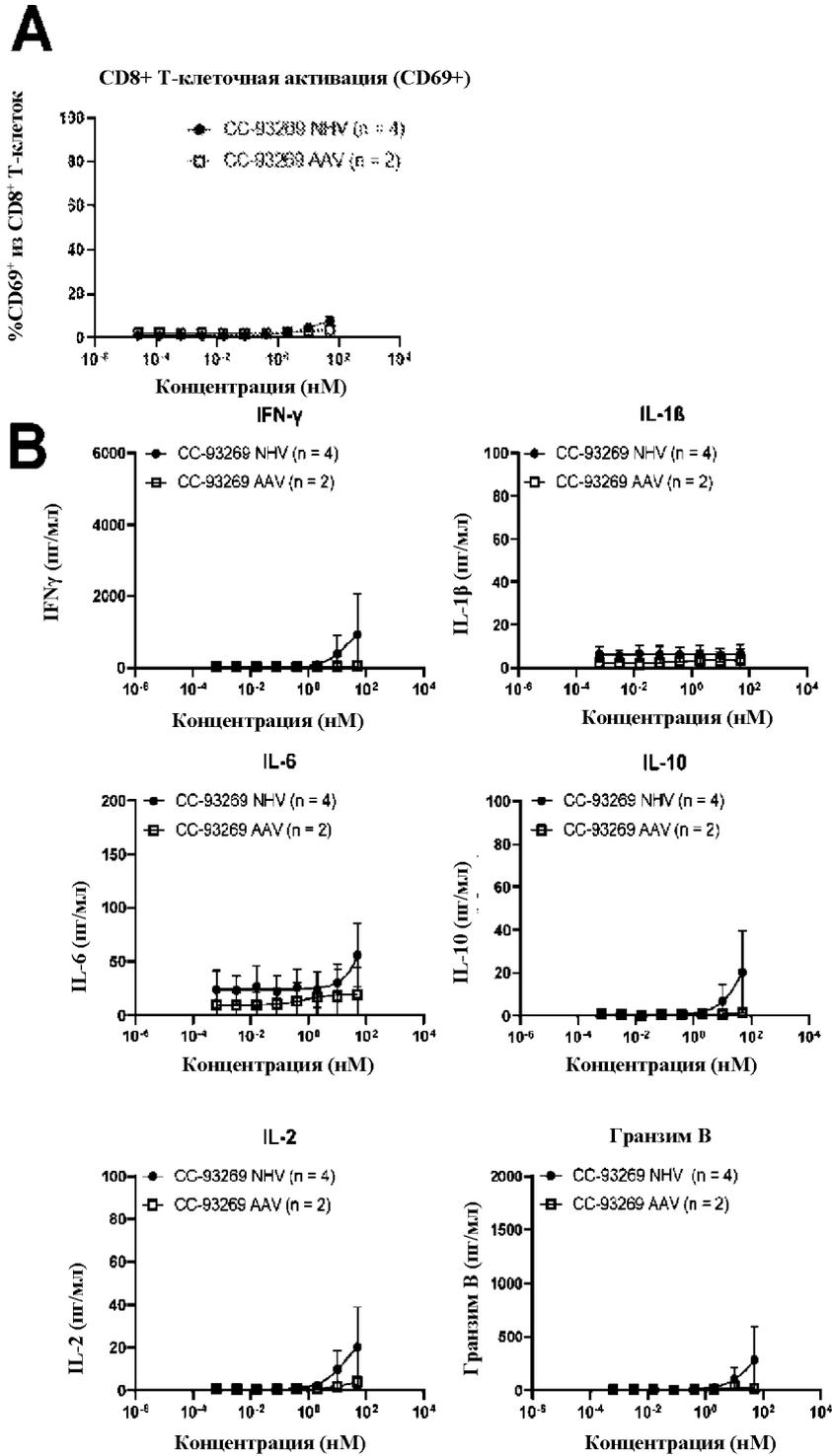
Т-клеточная активация



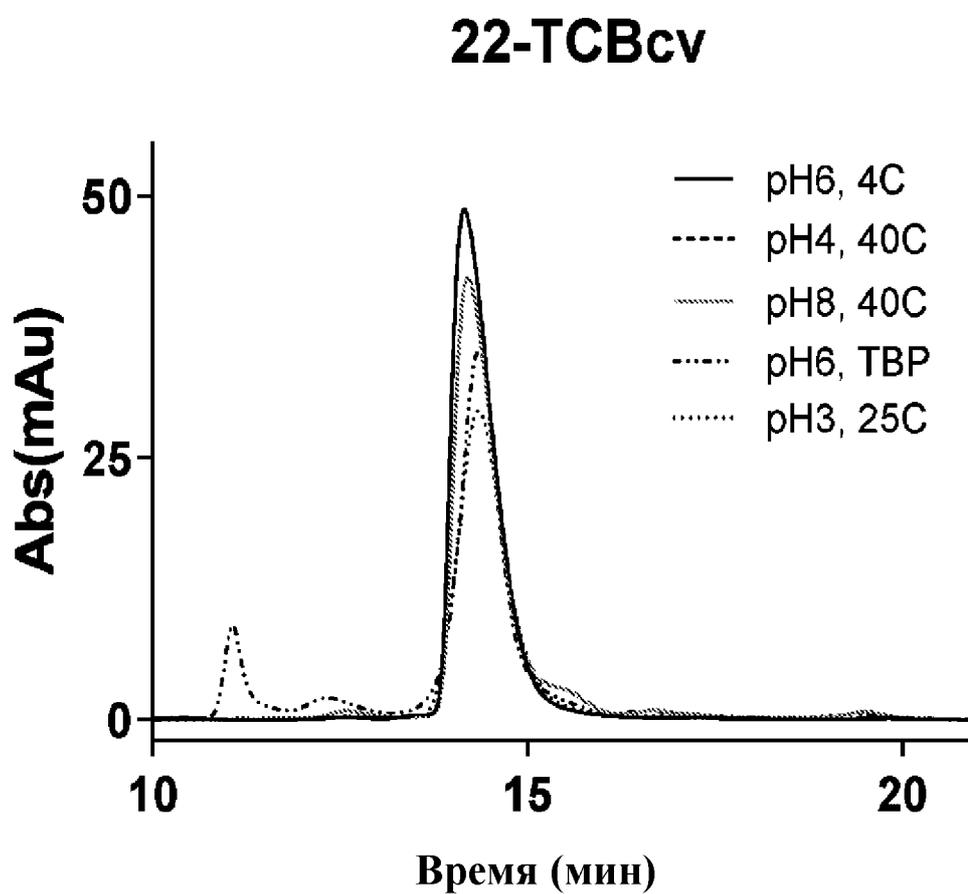
Фиг. 21

А**В**

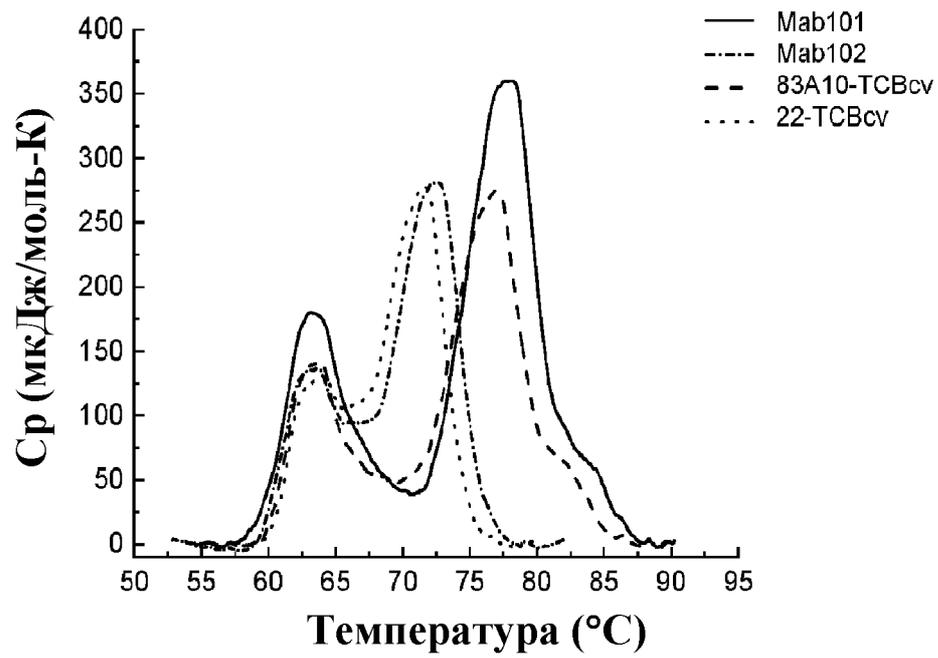
Фиг. 22



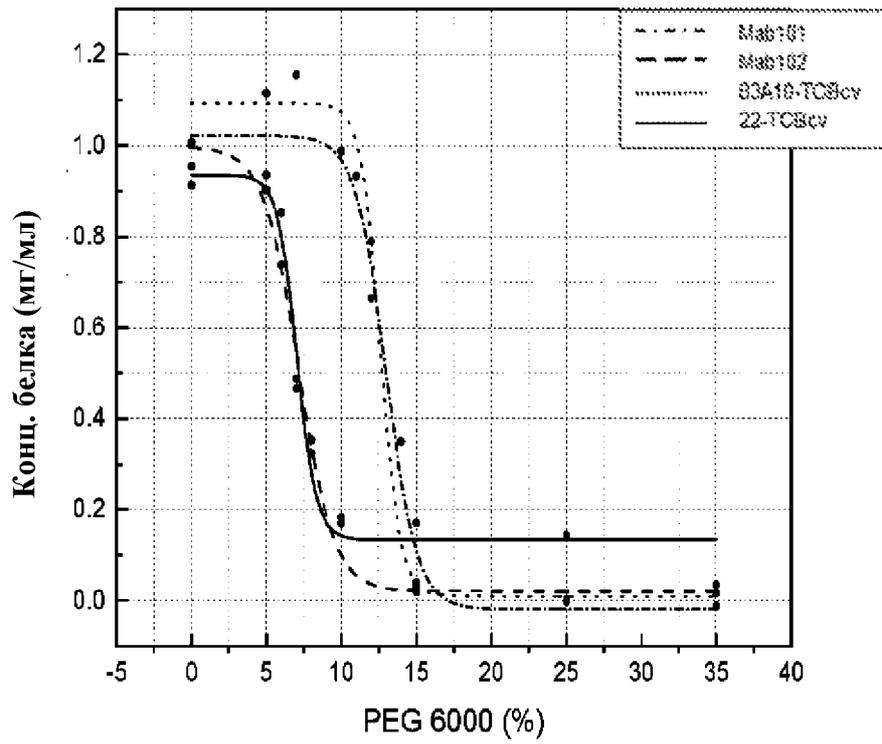
Фиг. 23



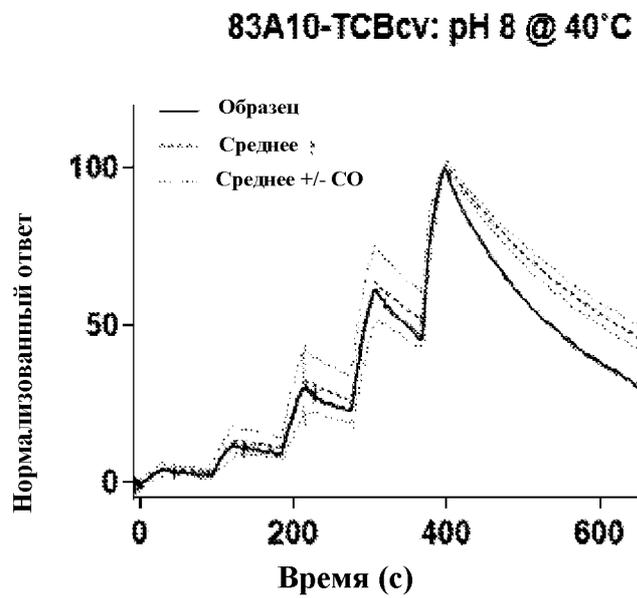
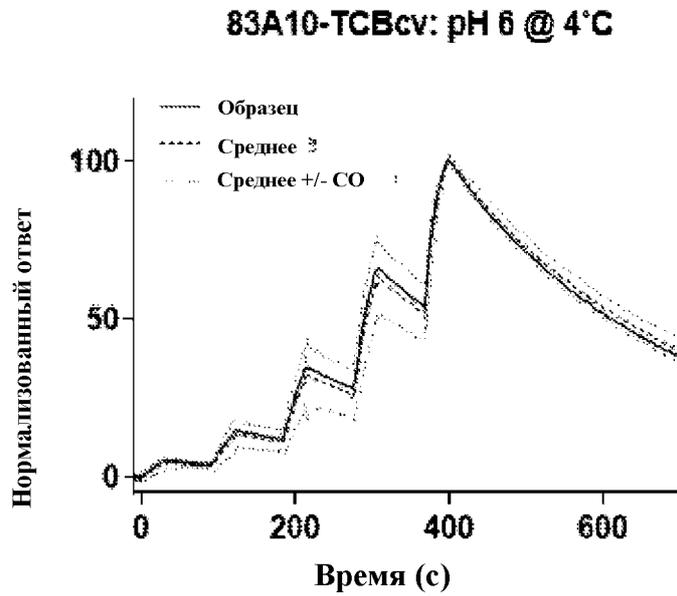
Фиг. 24



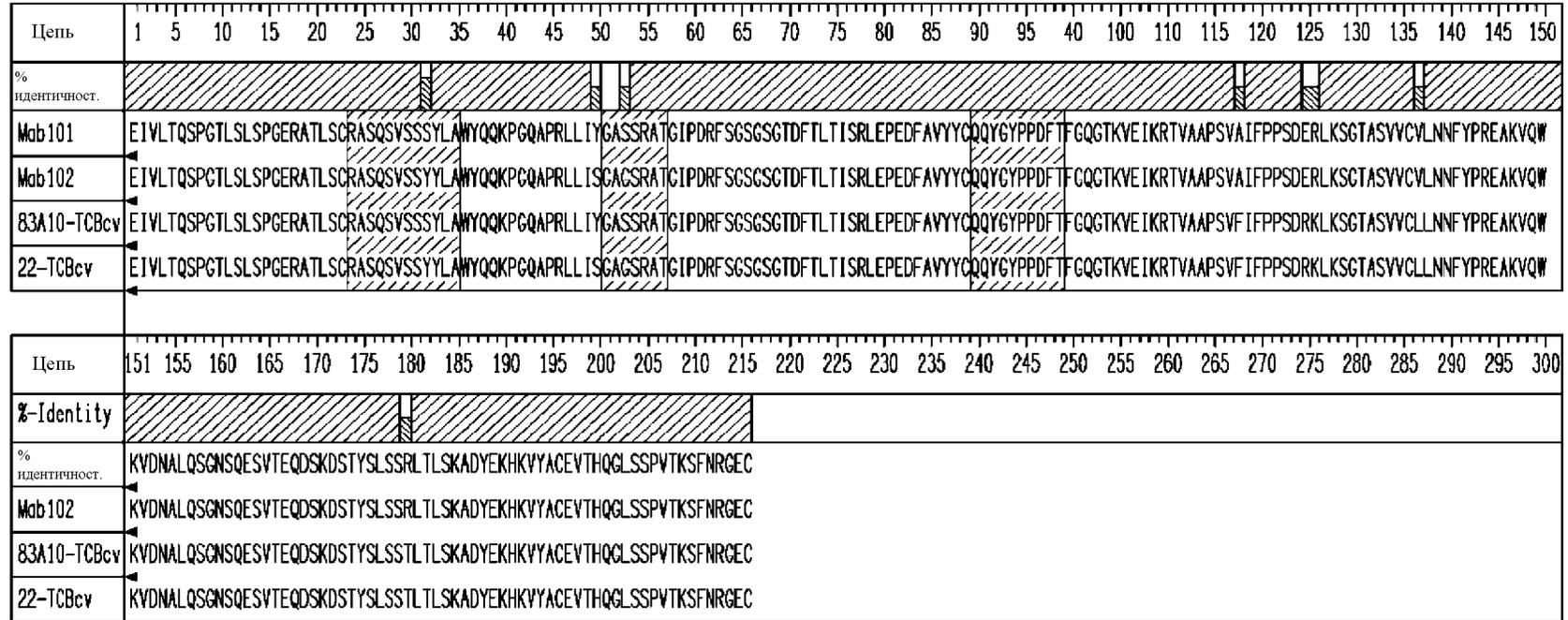
Фиг. 25



Фиг. 26



Легкая цепь ВСМА



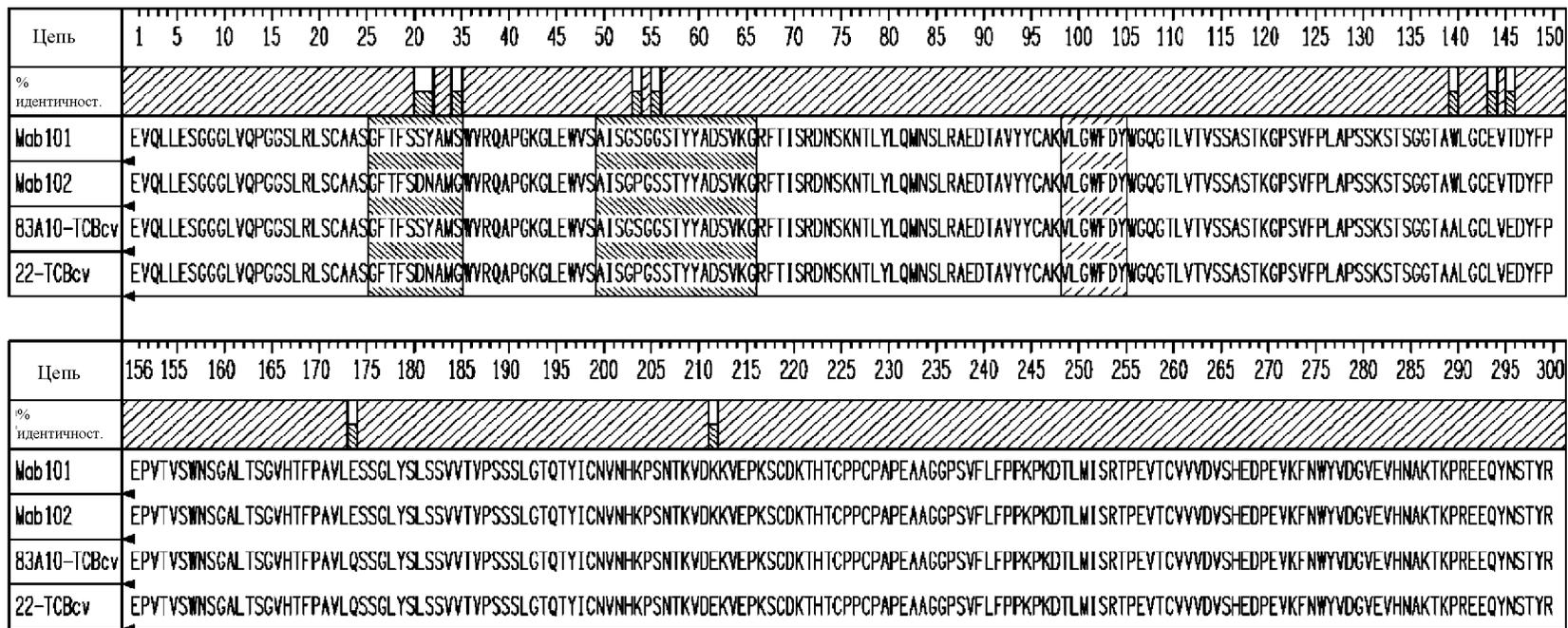
Фиг. 27

Легкая цепь CD3

Цепь	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	
% идентичност.																																
Mab101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNVRQAPGKLEWYSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAHYMGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																															
Mab102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNVRQAPGKLEWYSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAHYMGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																															
83A10-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNVRQAPGKLEWYSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAHYMGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																															
22-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNVRQAPGKLEWYSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAHYMGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																															
Цепь	151	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	
% идентичност.																																
Mab101	YCLLNNFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESYTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																															
Mab102	YCLLNNFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESYTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																															
83A10-TCBcv	YCLLNNFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESYTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																															
22-TCBcv	YCLLNNFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESYTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																															
Цепь	301	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350																					
% идентичност.																																

Фиг. 27 продолжение

Тяжелая цепь



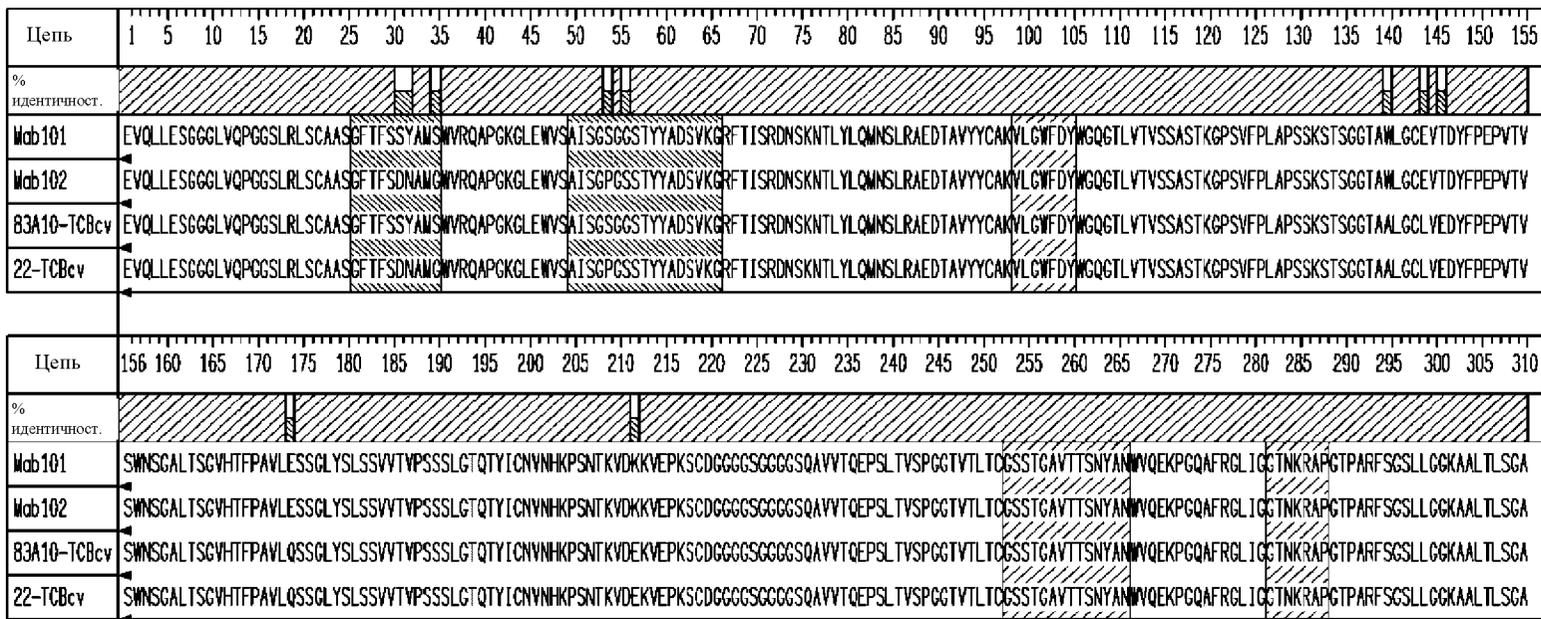
Фиг. 27 продолжение

Тяжелая цепь

Цепь	301 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
% идентичност.	
Mab101	VVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Mab102	VVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
83A10-TCBcv	VVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22-TCBcv	VVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Цепь	451 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
% идентичност.	

Фиг. 27 продолжение

Тяжелая цепь-тяжелая цепь



Фиг. 27 продолжение

Тяжелая цепь-тяжелая цепь

Цепь	311 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465
% идентичност.	
Mab101	QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVF
Mab102	QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVF
83A10-TCBcv	QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVF
22-TCBcv	QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVF
Цепь	466 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620
% идентичност.	
Mab101	LFPPKPKDTLWISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKCQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLLCVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPP
Mab102	LFPPKPKDTLWISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKCQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLLCVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPP
83A10-TCBcv	LFPPKPKDTLWISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKCQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLLCVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
22-TCBcv	LFPPKPKDTLWISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKCQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLLCVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

Фиг. 27 продолжение

Тяжелая цепь-тяжелая цепь

Цепь	621 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670
% идентичност.	
Mab101	VLDSDGCSFFLYSKLTVDKSRVQGGNWFSCSYMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
Mab102	VLDSDGCSFFLYSKLTVDKSRVQGGNWFSCSYMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
83A10-TCBcy	VLDSDGCSFFLYSKLTVDKSRVQGGNWFSCSYMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
22-TCBcy	VLDSDGCSFFLYSKLTVDKSRVQGGNWFSCSYMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 27 продолжение