

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390860 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.01(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.09.17

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ CD38 И/ИЛИ CD28, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/080,172

(32) 2020.09.18

(33) US

(86) PCT/US2021/050850

(87) WO 2022/061098 2022.03.24

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

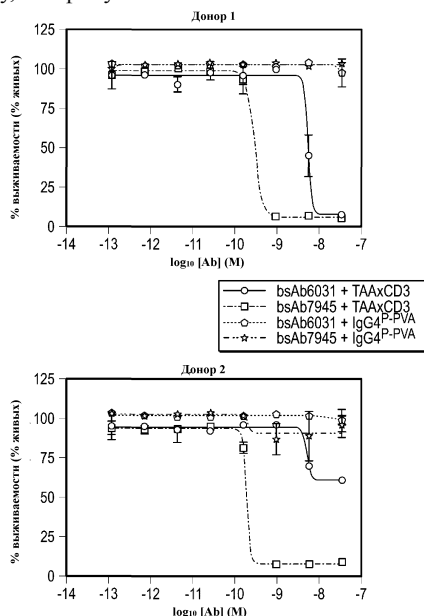
(72) Изобретатель:

Дилилло Дэвид, Херманн Айнур,
Киршнер Джессика, Олсон Кара,
Синешкова Ольга, Смит Эрик,
Уллман Эрика (US)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) CD38 экспрессируется на злокачественных плазматических клетках. CD28 представляет собой костимулирующую молекулу, необходимую для активации и выживания Т-клеток. В данном документе предусмотрены новые антитела к CD38, антитела к CD28 и биспецифические антитела (bsAb), которые связываются одновременно с CD38 и CD28 и действуют как костимулирующие средства для активации Т-клеток посредством связывания CD80 и/или CD86. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению способны подавлять рост опухолей, экспрессирующих CD38. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению применимы для лечения заболеваний и нарушений, при которых требуется и/или терапевтически полезен активизированный или индуцированный иммунный ответ, нацеленный на CD38. Например, биспецифические антитела по настоящему изобретению применимы для лечения различных видов рака, включая множественную миелому, лимфому и лейкоз.



A1

202390860

202390860

A1

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ CD38 И/ИЛИ CD28, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, включая антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам (например, биспецифическим антителам), которые специфичны в отношении CD38 и/или CD28, и способам их применения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей подается одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием «10786WO01_Sequence_Listing_ST25», дата создания 17 сентября 2021 года, и размером приблизительно 56 Кб. Перечень последовательностей, содержащийся в этом документе формата ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Множественная миелома (ММ) является вторым наиболее распространенным раком крови после неходжкинской лимфомы с распространенностью ~120000, примерно 30000 новых случаев и 13000 смертей каждый год в США. ММ характеризуется клональной экспансией злокачественных плазматических клеток, которые секретируют цитокины нерегулируемым образом. Продукция цитокинов, особенно IL-6, вызывает локализованное повреждение органов и тканей, ответственное за множество симптомов, ассоциированных с миеломой. Субъекты с ММ страдают от боли в костях и остеопороза, анемии, нарушения функции почек и почечной недостаточности, бактериальных инфекций и неврологических нарушений. ММ редко излечима, средняя продолжительность жизни составляет 4-5 лет. Хотя в лечении ММ был достигнут прогресс, новые способы лечения непропорционально полезнее более молодым пациентам. Прогноз у пациентов с

рецидивом ММ неблагоприятный, и срочно необходимы новые терапевтические подходы.

[0004] CD38, также известный как циклическая ADP-рибоза-гидролаза, представляет собой поверхностный гликопротеин с молекулярной массой 45 кДа, экспрессируемый на тимоцитах, некоторых активированных Т-клетках и В-клетках периферической крови, плазматических клетках и дендритных клетках. CD38 действует как эктофермент, участвующий в метаболизме внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD^+) и цитоплазматического никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADP) (Howard, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* (1993) 262:1056–9), что приводит к образованию Ca^{2+} -мобилизующих соединений, таких как циклическая аденозиндифосфат (ADP) рибоза, ADP-рибоза (ADPR) и адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты. Регуляция кальция приводит к активации сигнальных путей, которые контролируют широкий спектр физиологических функций, включая пролиферацию лимфоцитов, высвобождение инсулина поджелудочной железой, сокращение сердечной мышцы, хемотаксис нейтрофилов и активацию Т-клеток. Ферментативная активность CD38 регулирует уровни NAD^+ и улучшает функцию ингибиторов протеасом (Cagnetta, et al. Intracellular NAD^+ depletion enhances bortezomib-induced anti-myeloma activity. *Blood* (2013) 122:1243–55). Кроме того, ADPR может метаболизироваться с помощью CD203a/PC-1 и CD73 с образованием иммуносупрессивной молекулы аденозина (ADO), облегчающей ускользание опухолевых клеток из-под контроля иммунной системы (Chillemi et al. Roles and modalities of ectonucleotidases in remodeling the multiple myeloma niche. *Front Immunol.* (2017) 8:305). CD38, по-видимому, способствует пролиферативному потенциалу В-хронического лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы; злокачественные плазматические клетки в костном мозге экспрессируют высокие и постоянные уровни CD38. Считается, что mAb к CD38 истощают CD38⁺ иммуносупрессивные клетки, такие как супрессорные клетки миелоидного происхождения, регуляторные Т-клетки и регуляторные В-клетки, что приводит к повышению противоопухолевой активности иммунных эффекторных

клеток. Даратумумаб, антитело к CD38, был одобрен для лечения пациентов с множественной миеломой, рефрактерных к традиционной терапии.

[0005] Активация Т-клеток включает стимуляцию высокоспецифичного Т-клеточного рецептора (TCR) антигенпрезентирующей клеткой (такой как дендритная клетка), презентующей свой специфический антиген в своем главном комплексе гистосовместимости (МНС) класса II, и может быть облегчена костимулирующими молекулами, такими как CD28. CD28 представляет собой гомодимерный рецептор с молекулярной массой 44 кДа и дисульфидной связью, который гликозилирован по пяти различным сайтам. CD28 экспрессируется на Т-клетках (95% покоящихся CD4⁺ клеток и 50% покоящихся CD8⁺ Т-клеток в периферической крови человека) и плазмобластах и обеспечивает костимулирующую передачу сигналов, необходимую для активации и выживания Т-клеток. Костимуляция происходит, когда CD28 на поверхности Т-клетки связывается с CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на антигенпрезентирующей клетке. Экспрессия CD80 активизируется в антигенпрезентирующих клетках (APC) при активации, а CD86 конститутивно экспрессируется на APC. Зависящая от CD28 костимуляция Т-хелперов обеспечивает усиление транскрипции IL-2R и IL-2 (что приводит к пролиферации Т-клеток), индуцирование экспрессии Bcl-XL (что повышает выживаемость Т-клеток) и увеличение продукции IL-4 (что приводит к дифференцировке Th2), IFN γ , IL-1, TNF, IL-5, различных хемокинов и их рецепторов. Кроме того, CD28 индуцирует экспрессию или активизацию ряда других костимулирующих и регуляторных молекул, включая ICOS, 4-1BB и CTLA-4, наряду с молекулами CD40L, необходимыми для взаимодействия Т- и В-клеток. Mak and Saunders, *The Immune Response, Basic and Clinical Principles*, Academic Press, 2006. TGN1412 представляет собой моноклональное антитело-суперагонист CD28, которое преимущественно активирует регуляторные Т-клетки (T_{Reg}) в отсутствие костимуляции TCR. Attarwala, *TGN1412: From Discovery to Disaster*. J Young Pharm. 2010, 2(3): 332-6. К сожалению, фаза I клинических испытаний привела к быстрой полиорганной недостаточности и тяжелому синдрому высвобождения цитокинов (цитокиновый шторм) у всех шести добровольцев. *Id.*

[0006] Таким образом, в данной области техники существует потребность в

альтернативных подходах к лечению рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение частично относится к моноспецифическим антителам, которые связывают CD38 или CD28, и биспецифическим антителам, которые одновременно связывают CD38 и CD28, и их применению для лечения различных заболеваний, в том числе рака.

[0008] Антитела или биспецифические антитела можно использовать отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения рака, экспрессирующего CD38.

Антитела к CD38 и их антигенсвязывающие фрагменты

[0009] В одном аспекте в данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD38 человека. Антитела могут быть применимы, среди прочего, для нацеливания на клетки, экспрессирующие CD38, и/или для индукции апоптоза. В определенных вариантах осуществления антитела могут быть применимы для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC) против CD38+ раковых клеток. Антитела к CD38, предусмотренные в данном документе, или их антигенсвязывающие части могут быть включены в состав биспецифического антитела, которое способствует направленной на CD38 цитотоксичности определенных типов клеток, таких как опухолевые клетки.

[0010] Иллюстративные антитела к CD38, предусмотренные в данном документе, перечислены в таблицах 1 и 2. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), а также определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из иллюстративных антител к CD38. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR,

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к CD38.

[0011] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0012] Также в данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0013] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 (например, mAb1) и 32/48 (например, mAb2).

[0014] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1),

содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0015] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0016] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0017] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0018] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из

аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0019] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0020] В данном документе предусмотрены антитела к CD38 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/24 (например, mAb1); 38/54 (например, mAb2).

[0021] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (например, mAb1) и 34-36-38-50-52-54 (например, mAb2).

[0022] В связанном варианте осуществления в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных для любого из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1. Например, в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 (например, mAb1) и 32/48 (например, mAb2).

[0023] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFDDYA (SEQ ID NO: 4 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: ISWKSDNI (SEQ ID NO: 6 или ее вариант); и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: AKALGGWKFDYYYGMDV (SEQ ID NO: 8 или ее вариант); и

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант).

[0024] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGPFRSSS (SEQ ID NO: 34 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IPILGKT (SEQ ID NO: 36 или ее вариант); и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: VRGSSLFDY (SEQ ID NO: 38 или ее вариант); и

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY

(SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант).

[0025] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWK
SDNIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALGGWKFDYYY
GMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 2 или ее вариант); и

LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант).

[0026] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFRSSSFWSVRQAPGQGLEWMGGIIPILG
KTNYAQKFQGRITIVTDESTTTVYMELSSLRSEDTAVFYCVRGSSLFDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO: 32 или ее вариант); и

LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTEKVEIK (SEQ ID
NO: 48 или ее вариант).

[0027] В данном документе также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к CD38 или их части. Например, в настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит

полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0028] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0029] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0030] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0031] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0032] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0033] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0034] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере

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

[0035] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т. е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1.

[0036] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т. е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител к CD38, перечисленных в таблице 1.

[0037] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 2, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее. В определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получены из одного и

того же антитела к CD38, перечисленного в таблице 1.

[0038] В данном документе предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела к CD38. Например, В данном документе предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т. е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[0039] В данном документе предусмотрены антитела к CD38, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например для увеличения противоопухолевой активности, такой как функциональное свойство антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. JBC 277: 26733 2002). В других вариантах применения модификацию, представляющую собой галактозилирование, можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0040] В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которые специфически связываются с CD38, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, которая представляет собой комбинацию антитела к CD38 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к CD38 обеспечивается преимущество. К иллюстративным средствам, которые можно преимущественно объединять с антителом к CD38, относятся без ограничения

средства, которые обеспечивают связывание и/или инактивацию передачи сигнала CD38 (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т. д.), и/или средства, которые непосредственно не связываются с CD38, но, тем не менее, активируют или стимулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные комбинированные терапевтические препараты и комбинированные составы, включающие антитела к CD38 по настоящему изобретению, раскрыты в других частях данного документа.

[0041] В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены терапевтические способы для облегчения лечения рака с использованием антитела к CD38 или антигенсвязывающей части антитела к CD38, раскрытых в данном документе, где терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD38. Подлежащее лечению нарушение представляет собой какое-либо заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем подавления активности или передачи сигнала CD38.

Антитела к CD28 и их антигенсвязывающие фрагменты

[0042] В другом аспекте в данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 человека. Антитела в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения применимы, среди прочего, для связывания иммунных клеток, экспрессирующих CD28, включая CD4+, CD8+, плазматические клетки и естественные клетки-киллеры, и для костимулирования активации Т-клеток, например, в обстоятельствах, когда опосредованное Т-клетками уничтожение является выгодным или требуемым. Антитела к CD28 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть включены в состав биспецифического антитела, которое направляет активацию Т-клеток на определенные типы клеток, такие как опухолевые клетки.

[0043] Иллюстративные антитела к CD28, предусмотренные в данном документе, перечислены в таблицах 4 и 5 данного документа. В таблице 4

представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), а также определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из иллюстративных антител к CD28. В таблице 5 представлены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к CD28.

[0044] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0045] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0046] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 4, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 4. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из

иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18 (например, mAb3) и 40/48 (например, mAb4).

[0047] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0048] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0049] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0050] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 4, или по

сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0051] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0052] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0053] В данном документе предусмотрены антитела к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 4, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 4. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16/24 (например, mAb3) и 46/54 (например, mAb4).

[0054] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24 (например, mAb3) и 42-44-46-50-52-54 (например, mAb4).

[0055] В связанном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных для любого из иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4. Например, в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18 (например, mAb3); 40/48 (например, mAb4).

[0056] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFSRNN (SEQ ID NO: 12 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: ISSNGGRT (SEQ ID NO: 14 или ее вариант); и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: TRDDELLSFDY (SEQ ID NO: 16 или ее вариант); и

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант).

[0057] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе,

антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGSISSYY (SEQ ID NO: 42 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IYYSGIT (SEQ ID NO: 44 или ее вариант); и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 46 или ее вариант); и

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант).

[0058] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGGLEYVSGISSNG
GRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGG LRAADMAVYFCTR DDELLSFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10 или ее вариант); и

LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант).

[0059] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGISISSYYWSWIRQPPGKGGLEWIGYIYYSGITH
YNPSLKS RVTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYYGMDVWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 40 или ее вариант); и

LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO: 48 или ее вариант).

[0060] В данном документе также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к CD28 или их части. Например, в настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0061] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0062] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0063] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты,

кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0064] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0065] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0066] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%

идентичностью последовательности в отношении нее.

[0067] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

[0068] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т. е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4.

[0069] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т. е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител к CD28, перечисленных в таблице 4.

[0070] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 4, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 4. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере

99% идентичностью последовательности в отношении нее, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 5, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR получены из одного и того же антитела к CD28, перечисленного в таблице 4.

[0071] В данном документе предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела к CD28. Например, в настоящем изобретении включены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т. е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 4. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[0072] В данном документе предусмотрены антитела к CD28, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например для увеличения функционального свойства антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения модификацию, представляющую собой галактозилирование, можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0073] В данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которые

специфически связывают CD28, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, которая представляет собой комбинацию антитела к CD28 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к CD28 обеспечивается преимущество. К иллюстративным средствам, которые можно преимущественно объединять с антителом к CD28, относятся без ограничения другие средства, которые активируют или стимулируют активацию иммунных клеток (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т. д.), и/или средства, которые непосредственно не связываются с CD28 но, тем не менее, способствуют противоопухолевому ответу. Дополнительные комбинированные терапевтические препараты и комбинированные составы, включающие антитела к CD28 по настоящему изобретению, раскрыты в других частях данного документа.

[0074] В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены терапевтические способы для стимуляции активации Т-клеток с использованием антитела к CD28 или антигенсвязывающей части антитела, где терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD28. Подлежащее лечению нарушение представляет собой какое-либо заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем стимуляции активности или передачи сигнала CD28.

Биспецифические антитела, содержащие антигенсвязывающие домены к CD38 и к CD28

[0075] В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD28 и антиген-мишень. В соответствии с еще одним аспектом в настоящем изобретении предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы,

которые связывают CD38 и костимулирующую молекулу. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы связывают CD38 и CD28; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также упоминаются в данном документе как «биспецифические молекулы к CD38/CD28».

[0076] Связывающая CD38 часть биспецифической молекулы к CD38/CD28 применима для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют CD38 (например, плазматические клетки), а связывающая CD28 часть биспецифической молекулы применима для обеспечения костимуляции Т-клеток, активированных когнатным пептидом МНС или биспецифическими антителами к CD3, нацеленными на опухоль. Одновременное связывание CD38 на опухолевой клетке и CD28 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (клеточный лизис) подвергаемой нацеливанию опухолевой клетки под действием активированной Т-клетки. Следовательно, биспецифические молекулы к CD38/CD28 по настоящему изобретению применимы, среди прочего, для лечения заболеваний и нарушений, связанных с опухолями, экспрессирующими CD38 (например, лимфомами, лейкозами и множественной миеломой), или вызваны ими.

[0077] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предусмотренные В данном документе, содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28. Настоящее изобретение включает биспецифические молекулы к CD38/CD28 (например, биспецифические антитела), где каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) в паре с вариабельной областью легкой цепи (LCVR). В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из антигенсвязывающего домена к CD38 и антигенсвязывающего домена к CD28 содержит разные отдельные HCVR в паре с общей LCVR. Например, как проиллюстрировано в примере 4 в данном документе, сконструировали биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, где первый антигенсвязывающий домен содержит пару

HCVR/LCVR, полученную из антитела к CD38; и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученную из антитела к CD28, в паре с LCVR, полученной из антитела к CD38 (например, той же самой LCVR, которая включена в антигенсвязывающий домен к CD38). В таких вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие домены содержат разные HCVR к CD38 и к CD28, но имеют общую LCVR к CD38.

[0078] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в таблице 1. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленных в таблице 1. Настоящее изобретение также предусматривает биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, представленных в таблице 1, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, представленных в таблице 1.

[0079] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 32, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0080] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к

CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 48, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0081] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 и 32/48.

[0082] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 38 или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 54, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0083] В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/24 и 38/54.

[0084] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 34, или по

сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 36, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 50, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 52, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0085] Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38/CD28 по настоящему изобретению включают первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно с аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (например, bsAb6031) и 34-36-38-50-52-54 (например, bsAb7945).

[0086] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в таблице 4. Второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в таблице 4. В соответствии с определенными вариантами осуществления второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит любую из пар аминокислотных

последовательностей HCVR/LCVR, представленных в таблице 4. Настоящее изобретение также предусматривает биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, представленных в таблице 4, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, представленных в таблице 4.

[0087] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 40, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0088] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит переменную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 48, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0089] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18 и 40/48.

[0090] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 46, или по

сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 54, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0091] В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16/24 и 46/54.

[0092] В данном документе предусмотрены биспецифические молекулы к CD38/CD28, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 42, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 44, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 50, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и 52, или по сути сходной с ней последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0093] Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38/CD28, предусмотренные в данном документе, включают второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно с аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24 (например, bsAb6031) и 42-44-46-50-52-54 (например, bsAb7945).

[0094] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, полиспецифическая (например, биспецифическая) антигенсвязывающая молекула (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), которая связывает CD38 и CD28, включает:

(1)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFDDYA (SEQ ID NO: 4 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: ISWKSDNI (SEQ ID NO: 6 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: AKALGGWKFDY YYGMDV (SEQ ID NO: 8 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFSRNN (SEQ ID NO: 12 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: ISSNGGRT (SEQ ID NO: 14 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: TRDDELLSFDY (SEQ ID NO: 16 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную

последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант);

(2)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGPFRSSS (SEQ ID NO: 34 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IPILGKT (SEQ ID NO: 36 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: VRGSSLFDY (SEQ ID NO: 38 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGSISSYY (SEQ ID NO: 42 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IYYSGIT (SEQ ID NO: 44 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 46 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант);

(3)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWK
SDNIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALGGWKFDYYY

GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGGLEYVSGISSNG
GRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGGRLAADMAVYFCTRDELLSFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит
аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант);

(4)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFRSSSFVWRQAPGGGLEWMGGIIPILG
KTNIAQKFQGRITIVTDESTTTVYMESSLRSEDTAVFYCVRGSSSLFDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO: 32 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную
последовательность:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGGSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 48 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGGLEWIGYIYYSGITH
YNPSLKSRTVISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYYGMDVWG

QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 40 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 48 или ее вариант;

(5)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWK
SDNIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALGGWKFDYYY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLGK* (SEQ ID NO: 26 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 30
или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGLEWVSGISSNG
GRYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMGGSLRAADMAVYFCTRDELLESDYWG
QGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP

PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK*
 (SEQ ID NO: 28 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 30
 или ее вариант); или

(6)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGPFRSSSFVWRQAPGQGLEWMGGIIPILG
 KTNYAQKFQGRITIVTDESTTTVYMELSSLRSEDTAVFYCVRGSSSLFDYWGGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK* (SEQ ID
 NO: 56 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 60
 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGITH
YNPSLKSRTVISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYYGMDVWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK*
(SEQ ID NO: 58 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 60
или ее вариант).

[0095] В варианте осуществления, предусмотренном в данном документе, полиспецифическая (например, биспецифическая) антигенсвязывающая молекула (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), которая связывает CD38 и CD28, включает:

(1)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFDDYA (SEQ ID NO: 4 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: ISWKSDNI (SEQ ID NO: 6 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: AKALGGWKFDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 8 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая

содержит аминокислотную последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGSISSYY (SEQ ID NO: 42 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IYYSGIT (SEQ ID NO: 44 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 46 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант);

(2)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GGPFRSSS (SEQ ID NO: 34 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: IPILGKT (SEQ ID NO: 36 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: VRGSSLFDY (SEQ ID NO: 38 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 50 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 52 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 54 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: GFTFSRNN (SEQ ID NO: 12 или ее вариант); HCDR2, которая содержит аминокислотную

последовательность: ISSNGGRT (SEQ ID NO: 14 или ее вариант); HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: TRDDELLSFDY (SEQ ID NO: 16 или ее вариант); LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: QSISSY (SEQ ID NO: 20 или ее вариант); LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: AAS (SEQ ID NO: 22 или ее вариант); и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: QQSYSTPPIT (SEQ ID NO: 24 или ее вариант);

(3)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWK
SDNIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALGGWKFDYYY
GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGITH
YNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYYGMDVWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 40 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 48 или ее вариант);

(4)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGPFRSSSFWSVRQAPGQGLEWMGGIIPILG
KTNYAQKFQGRITIVTDESTTTVYMELSSLRSEDTAVFYCVRGSSSLFDYWGGQGLTV
TVSS (SEQ ID NO: 32 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит аминокислотную
последовательность:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 48 или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

HCVR1, которая содержит аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGGLEYVSGISSNG
GRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGG LRAADMAVYFCTRDEL LSF DYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10 или ее вариант); и LCVR1, которая содержит
аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 18 или ее вариант);

(5)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGGLEWVSGISWK
SDNIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKALGGWKFDYYY
GMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKV D KR
VESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTV D KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLGK* (SEQ ID NO: 26 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 30
или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGITH
YNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGVRRDYYYYGMDVWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK*
(SEQ ID NO: 58 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 60
или ее вариант); или

(6)

CD38-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGPFRSSSFWSVRQAPGQGLEWMGGIIPILG
KTNYAQKFQGRITIVTDESTTTVYMELSSLRSEDVAVFYCVRGSSSLFDYWGGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCP

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK* (SEQ ID
NO: 56 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 60
или ее вариант); и

CD28-связывающее плечо, которое содержит:

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGLYVSGISSNG
GRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGG LRAADMAVYFCTRDEL LSF DYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGP
PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK*
(SEQ ID NO: 28 или ее вариант); и

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 30
или ее вариант).

[0096] В другом аспекте в данном документе предусмотрены молекулы

нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR биспецифических антигенсвязывающих молекул к CD38/CD28, раскрытых в данном документе, в том числе молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в таблице 2 в данном документе, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в таблице 5 в данном документе, в любых их функциональных комбинации или расположении. Также настоящее изобретение охватывает рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител, и выделения полученных антител.

[0097] Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38/CD28, где любые из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD38, объединены, соединены или иным образом ассоциированы с любыми из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD28, с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD38 и CD28.

[0098] В данном документе предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38/CD28, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах применения может быть применима модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функционального свойства антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения модификацию, представляющую собой галактозилирование, можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0099] В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к CD38/CD28, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый

носитель. В связанном аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, которая представляет собой комбинацию биспецифической антигенсвязывающей молекулы к CD38/CD28 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с биспецифической антигенсвязывающей молекулой к CD38/CD28 обеспечивается преимущество. Иллюстративные средства, которые можно комбинировать с биспецифической антигенсвязывающей молекулой к CD38/CD28 с обеспечением преимущества, подробно обсуждаются в другом разделе данного документа.

[00100] В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены терапевтические способы для нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD38, с использованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы к CD38/CD28 по настоящему изобретению, где терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к CD38/CD28, предусмотренную в данном документе.

[00101] Настоящее изобретение также включает применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы к CD38/CD28, предусмотренной в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией CD38, или вызванного ею.

[00102] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00103] На фигурах 1-4 показаны цитотоксичность, активация Т-клеток, пролиферация Т-клеток и высвобождение цитокинов в опухолевых клетках H929 после обработки костимулирующими биспецифическими антителами к CD38xCD28 bsAb6031 и bsAb7954.

[00104] На фигурах 5-10 показана противоопухолевая активность *in vivo*

костимулирующих биспецифических антител к CD38хCD28 bsAb6031 и bsAb7954 отдельно или в комбинации с bsAb к BCMAхCD3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00105]Перед приведением описания настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[00106]Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в данном документе термин «приблизительно» при использовании в отношении конкретного упомянутого числового значения означает, что значение может отличаться от упомянутого значения на не более чем 1%. Например, используемое в данном документе выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[00107]Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

[00108]Используемое в данном документе выражение “CD28” относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в виде гомодимера. CD28 человека содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61 (внеклеточный домен CD28 человека (N19-P152).mFc), и/или имеет аминокислотную

последовательность, представленную под номером доступа NCBI NM_006139.3, и/или имеет аминокислотную последовательность предшественника изоформы 1 специфичного для Т-клеток поверхностного гликопротеина CD28, CD28 человека >NP_006130.1 (SEQ ID NO: 63).

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD28 человека (N19-P152).mFc (иммуноген)

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVY
GNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLD
NEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK
IKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRV
VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVE
KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK* (SEQ ID NO: 61)

последовательность mFc подчеркнута

[00109] Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они получены от отличных от человека видов. Таким образом, выражение «CD28» означает CD28 человека, если не указано, что он происходит из отличных от человека видов, например, «CD28 мыши», «CD28 обезьяны» и т. д.

[00110] Используемое в данном документе «антитело, которое связывает CD28» или «антитело к CD28» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают отдельную субъединицу CD28, а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD28. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связывать растворимый CD28 и/или CD28, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый CD28 включает природные белки CD28, а также рекомбинантные варианты белков CD28, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD28, в которых отсутствует трансмембранный

домен или которые иным образом не ассоциированы с клеточной мембраной.

[00111]Используемое в данном документе выражение «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности», означает один или более белков CD28, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, вследствие чего по меньшей мере часть белка CD28 располагается на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает белки CD28, содержащиеся в рамках функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» включает белок CD28, экспрессируемый как часть гомодимера на поверхности клетки. «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать белок CD28, экспрессируемый на поверхности клетки, которая в норме экспрессирует белок CD28, или состоять из него. В качестве альтернативы «CD28, экспрессируемый на клеточной поверхности» может содержать белок CD28, экспрессируемый на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует CD28 человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD28 на своей поверхности, или состоять из него.

[00112]Используемое в данном документе выражение “CD38”, также известное как циклическая ADP-рибоза-гидролаза, относится к гликопротеину, экспрессированному на злокачественных плазматических клетках. CD38 играет центральную роль в регуляции внутриклеточного уровня кальция. Белок имеет N-концевой цитоплазматический хвост, один трансмембранный домен и C-концевую внеклеточную область с четырьмя сайтами N-гликозилирования.

[00113]Используемые в данном документе выражения «антитело, которое связывает CD38» или «антитело к CD38» включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают CD38.

[00114]Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе, например, биспецифические антитела.

[00115]Используемый в данном документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (*например* CD38 или CD28). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (*например*, IgM). Термин «антитело» также предусматривает молекулы иммуноглобулинов, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к CD38 или антитела к CD28 (или их антигенсвязывающей части) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе параллельного сравнения двух или более CDR.

[00116]Используемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Используемые в данном документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий

фрагмент» антитела и т. п. включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или сконструированный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, которые специфически связывают антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с помощью любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[00117] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т. д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка небольшого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», используемым в данном документе.

[00118] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и обычно будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в смежном положении или в одной рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут располагаться в любом подходящем порядке друг относительно друга. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[00119] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут присутствовать в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством целой шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменным и/или константным доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, находящихся в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью

дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

[00120]Как и в случае с молекулами полного антитела антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат полиспецифических антител, в том числе иллюстративные форматы биспецифических антител, раскрытые в данном документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методик, доступных из уровня техники.

[00121]Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). «Зависимая от комплемента цитотоксичность» (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток антителом по настоящему изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность» (ADCC) относится к опосредованной клетками реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и за счет этого осуществляют лизис клетки-мишени. CDC и ADCC могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337, а также Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652–656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, необходимо ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

[00122]В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения моноспецифические антитела к CD38, моноспецифические антитела к CD28 или

биспецифические антитела к CD38 x CD28, предусмотренные в данном документе, представляют собой человеческие антитела. Предусматривается, что используемый в данном документе термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии иммуноглобулина человека (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или с помощью соматической мутации *in vivo*), например в CDR, и в частности CDR3. Однако подразумевается, что используемый в данном документе термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например мыши, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

[00123] Антитела по настоящему изобретению могут в некоторых вариантах осуществления представлять собой рекомбинантные антитела человека. Подразумевается, что используемый в данном документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют посредством рекомбинантных способов, такие как антитела, экспрессируемые с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описанные ниже), антитела, выделяемые из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанные ниже), антитела, выделяемые из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287–6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые посредством любых других способов, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные

человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[00124] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей размером приблизительно 150–160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью при тяжелых цепях. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула размером приблизительно 75–80 кДа, состоящая из соединенных ковалентной связью легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

[00125] Частота появления второй формы в различных изотипах интактного IgG обусловлена без ограничения структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирного участка антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирном участке шарнира IgG4 человека может значительно снизить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, как правило, наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнире, области C_H2 или C_H3, которые могут быть необходимы, например при получении, для обеспечения улучшения выхода требуемой формы антитела.

[00126] Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. Используемый в данном документе термин «выделенное антитело» означает антитело, которое было идентифицировано и отделено от по меньшей мере одного компонента его природного окружения и/или извлечено из такового. Например, антитело, которое было отделено или удалено от по меньшей мере

одного компонента из организма, или из ткани или клетки, в которых антитело существует или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в пределах рекомбинантной клетки. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело может по сути не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

[00127] Настоящее изобретение также предусматривает одноплечевые антитела, которые связывают CD38 или CD28. Как используется в данном документе, «одноплечевое антитело» означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела по настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 1 или таблице 4.

[00128] Антитела к CD38, антитела к CD28 или антитела к CD38 x CD28, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с

получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначаются как «мутации зародышевой линии»).

Специалист средней квалификации в данной области техники, беря за основу раскрытые в данном документе последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки из каркасного области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации с получением исходной последовательности зародышевой линии, например, мутации подвергнуты только остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или мутации подвергнуты только остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков из каркасной области и/или CDR подвергнуты мутации с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело).

[00129] Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR-областях, *например*, при этом определенные отдельные остатки подвергнуты мутации до соответствующего остатка последовательности определенной зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от последовательности первоначальной зародышевой линии, оставляют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций

зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящее изобретение охватывает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

[00130] В данном документе предусмотрены антитела к CD38, антитела к CD28 или антитела к CD38 x CD28, содержащие варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, в настоящем изобретении включены антитела к CD38, антитела к CD28 или антитела к CD38 x CD28, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, *например*, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или 1 консервативной аминокислотной заменой по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблицах 1, 4 или 7 в данном документе.

[00131] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может содержать более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными зонами на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуют аминокислоты из разных сегментов линейной полипептидной цепи, располагающиеся рядом в пространстве. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[00132] Термин «идентичность по сути» или «по сути идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании с учетом соответствующих нуклеотидных вставок или

делений с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле эталонной нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

[00133] Применительно к полипептидам термин «сходство по сути» или «по сути сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с применением значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена по сути не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, если две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательности или степень сходства можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи:

глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443–1445, которая включена в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативным» замещением является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

[00134] Для полипептидов сходство последовательностей, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с применением показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения степени гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательности в областях наибольшего перекрытия между

последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403–410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Мутации зародышевой линии

[00135] Антитела к CD38, антитела к CD28 и биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

[00136] В данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутации с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначены как «мутации зародышевой линии»), и характеризуются практически не обнаруживаемым связыванием с антигеном CD38 или антигеном CD28.

Связывающие свойства антител

[00137] Используемый в данном документе термин «связывание» в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела или

Fc-содержащего белка с любым, например, заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, таким как взаимодействие антитело-антиген.

[00138] Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_D , составляющему приблизительно 10^{-7} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе BIAcore с использованием антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка в качестве анализата (или антилиганда). Традиционно также используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания с сортировкой флуоресцентно-активируемых клеток (FACS), и данные, полученные в FACS, хорошо коррелируют с другими методами, такими как конкурентное связывание лигандов с радиоактивной меткой и SPR (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223–31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1–2):68–77).

[00139] Соответственно, антитело или антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению связываются с заранее определенным антигеном или молекулой (рецептором) клеточной поверхности, с аффинностью, соответствующей значению K_D , которое в по меньшей мере десять раз ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В соответствии с настоящим изобретением аффинность антитела, соответствующая значению K_D , которое равно или в менее чем десять раз ниже, чем значение для неспецифического антигена, может считаться необнаруживаемым связыванием, однако такое антитело можно спаривать со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела по настоящему изобретению.

[00140] Термин « K_D » (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе диссоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела с антигеном. Между K_D и аффинностью связывания существует обратная зависимость,

следовательно, чем меньше значение K_D , тем выше, т. е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и, наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) с ее молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном Y) может быть выражена как отношение связывания, определяемое путем деления большего значения K_D (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее K_D (более высокая или более сильная аффинность), например, выраженное как аффинность связывания в 5 раз или 10 раз больше, в зависимости от обстоятельств.

[00141] Термин « k_d » (сек⁻¹ или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости диссоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела. Указанное значение также обозначается как значение k_{off} .

[00142] Термин " k_a " (М⁻¹ х сек⁻¹ или 1/М/с) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела.

[00143] Термин « K_A » (М⁻¹ или 1/М) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе скорости ассоциации связывания антитела или связывающего фрагмента антитела. Равновесную константу ассоциации получают путем деления k_a на k_d .

[00144] Термин «EC₅₀» или «EC₅₀» относится к полумаксимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая вызывает половинный ответ между исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия. EC₅₀ фактически представляет концентрацию антитела, при которой

наблюдается 50% от его максимального эффекта. В определенных вариантах осуществления значение EC_{50} равно концентрации антитела по настоящему изобретению, которая дает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими CD28 или опухолеассоциированный антиген (*например*, CD38), как определено, *например*, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при повышенном значении EC_{50} или полумаксимальной эффективной концентрации.

[00145] В одном варианте осуществления уменьшенное связывание можно определить как повышение концентрации антитела EC_{50} , которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством целевых клеток.

[00146] В другом варианте осуществления значение EC_{50} представляет концентрацию антитела по настоящему изобретению, которая вызывает полумаксимальное истощение популяции целевых клеток за счет цитотоксической активности Т-клеток. Таким образом, повышенная цитотоксическая активность (*например*, опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток) наблюдается при уменьшенном значении EC_{50} или полумаксимальной эффективной концентрации.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы

[00147] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60–69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238–244. Моноспецифические антитела к CD38, моноспецифические антитела к CD28 или биспецифические антитела к CD38 x CD28 по настоящему изобретению могут быть соединены или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально соединены (*например*, посредством образования химической связи, генетического слияния,

нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или полиспецифического антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

[00148] Подразумевается, что использование в данном документе выражения «антитело к CD28» или «антитело к CD38» включает как моноспецифические антитела к CD28 или к CD38, так и биспецифические антитела, содержащие CD28-связывающее плечо и CD38-связывающее плечо. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает CD28 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении CD38 человека. CD28-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 4 в данном документе.

[00149] В определенных вариантах осуществления CD28-связывающее плечо связывается с CD28 человека и облегчает активацию человеческих Т-клеток. В определенных вариантах осуществления CD28-связывающее плечо связывается с CD28 человека и индуцирует активацию человеческих Т-клеток. В других вариантах осуществления CD28-связывающее плечо связывается с CD28 человека и индуцирует уничтожение клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген, в рамках биспецифического или полиспецифического антитела. CD38-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 1 в данном документе.

[00150] Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD28 и CD38. Такие молекулы могут обозначаться в данном документе, *например*, как биспецифические молекулы «к CD38 x CD28», или «к CD38/CD28», или «к CD38xCD28», или «CD38xCD28», или с помощью других аналогичных терминов (*например*, к CD28/CD38).

[00151] Используемый в данном документе термин «CD38» относится к белку CD38

человека, если не указано, что он происходит из вида, отличного от человека (например, «CD38 мыши», «CD38 обезьяны» и т. д.). Белок CD38 имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 62 (внеклеточный домен CD38 человека (V43-I300).mFc), и/или имеет аминокислотную последовательность, представленную под номером доступа NCBI NP_001766.2 или NM_001775.3.

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD38 человека (V43-I300).mFc (иммуноген)

VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGA
FISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTL
LGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVV
HVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIK
ELESIIISKRNIFSCKNYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNL
LGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTT
HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG
SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK* (SEQ ID NO:
62) *последовательность mFc подчеркнута*

[00152] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD38 и CD28, могут содержать антигенсвязывающую молекулу к CD28, которая связывается с CD28 со слабой аффинностью связывания, например характеризуется K_D , составляющей более чем приблизительно 200 мкМ, как измерено посредством анализа аффинности связывания *in vitro*.

[00153] Используемое в данном документе выражение «антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий из по меньшей мере одной определяющей комплементарность области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR), специфически связывается с конкретным антигеном. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула

представляет собой антитело или фрагмент антитела в том качестве, как эти термины определены в другом разделе в данном документе.

[00154]Используемое в данном документе выражение «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в пределах биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит по меньшей мере одну CDR, которая отдельно или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (*например*, CD38), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, другой антиген (*например*, CD28).

[00155]В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В рамках биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (*например*, биспецифического антитела), CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначаться с помощью префикса «D1», а CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться с помощью префикса «D2». Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначаться в данном документе как D1-HCDR1, D1-HCDR2 и D1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться в данном документе как D2-HCDR1, D2-HCDR2 и D2-HCDR3.

[00156]В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; и (b) три определяющие

комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00157] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 20, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00158] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

[00159] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который содержит: (a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся

в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40; и (b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

[00160] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; и (b) второй антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 24.

[00161] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый

антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 38; и (b) второй антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 44 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 46. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 50, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 52 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 54.

[00162] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 24; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 16; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 18; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 18.

[00163] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная

биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит: (a) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38 человека и содержит CDR из HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 32, и CDR из LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 48; и (b) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28 человека. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен содержит CDR из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 и 32/48. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 и 34-36-38-50-52-54. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/18 и 32/48. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/18 и 40/48.

[00164] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула конкурирует за связывание с CD38 или связывается с тем же эпитопом на CD38, что и эталонное антитело, где эталонное антитело предусматривает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело к CD38/CD28, раскрытое в данном документе.

[00165] В определенных иллюстративных вариантах осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула конкурирует за связывание с CD3 человека или связывается с тем же эпитопом на CD3 человека, что и эталонное антитело, где эталонное антитело предусматривает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело к CD38/CD28, раскрытое в данном документе.

[00166] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, рассмотренные выше или в данном документе, могут быть биспецифическими антителами. В некоторых

случаях биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG1. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи IgG человека представляет собой изотип IgG4. В различных вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который снижает связывание рецептора Fcγ по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

[00167]Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или косвенно соединены друг с другом с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. В качестве альтернативы каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена могут быть соединены с отдельным доменом мультимеризации. Ассоциация одного домена мультимеризации с другим доменом мультимеризации облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, за счет чего образуется биспецифическая антигенсвязывающая молекула. Используемый в данном документе «домен мультимеризации» подразумевает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которые характеризуются способностью ассоциировать с вторым доменом мультимеризации с такой же или подобной структурой или составом. Например, домен мультимеризации может представлять собой полипептид, содержащий домен C_{H3} иммуноглобулина. Неограничивающим примером компонента мультимеризации является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C_{H2}-C_{H3}), например, Fc-домен IgG, выбранного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в пределах каждой изотипической группы.

[00168]Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению обычно содержат два домена мультимеризации, например, два Fc-домена, каждый из которых по отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй домены мультимеризации могут относиться к одному и тому же изотипу IgG, такому как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. В качестве альтернативы первый и второй домены мультимеризации могут относиться к

разным изотипам IgG, таким как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

[00169] В определенных вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие домены мультимеризации включают пептиды или полипептиды, содержащие лейциновую застежку, мотив спираль-петля или мотив суперспираль, или состоящие из них.

[00170] Любой формат или технологию биспецифического антитела можно использовать для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Например, антитело или его фрагмент, характеризующиеся первой антигенсвязывающей специфичностью, можно функционально связать (например, путем образования химической связи, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, характеризующиеся второй антигенсвязывающей специфичностью, с получением биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, *например*, биспецифические форматы на основе scFv или диател, гибриды IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадруму, «выступы-во-впадины», общую легкую цепь (*например*, общую легкую цепь со структурой «выступы-во-впадины» и т. д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, «лейциновую застежку», Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (для обзора вышеизложенных форматов *см.*, *например*, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки).

[00171] В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению домены мультимеризации, *например*, Fc-домены, могут содержать одно или более аминокислотных изменений (*например*, вставки, делеции или замены) по сравнению со встречающейся в природе версией Fc-домена дикого типа. Например, настоящее изобретение включает биспецифические

антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, которые приводят к получению модифицированного Fc-домена, характеризующегося модифицированным взаимодействием связывания (*например*, усиленным или ослабленным) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, где модификация увеличивает аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (*например*, E или Q); 250 и 428 (*например*, L или F); 252 (*например*, L/Y/F/W или T), 254 (*например*, S или T) и 256 (*например*, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (*например*, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (*например*, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S); модификацию 428L, 259I (*например*, V259I) и 308F (*например*, V308F); модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (*например*, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P).

[00172] Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, где первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере одно различие в аминокислотах уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотное различие. В одном варианте осуществления первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., *например*, патент США № 8586713.

Дополнительные модификации, которые могут встречаться в пределах второго C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2, а также Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4.

[00173] В определенных вариантах осуществления Fc-домен может быть химерным, объединяющим последовательности Fc, полученные из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный Fc-домен может содержать часть или всю последовательность C_H2, полученную из области C_H2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный Fc-домен также может содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью, полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- к С-концу: [C_H1 IgG4] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [C_H2 IgG4] - [C_H3 IgG4]. Другой пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- к С-концу: [C_H1 IgG1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [C_H2 IgG4] - [C_H3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в публикации заявки на патент США 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 г., которая включена в данный документ во всей своей полноте. Химерные Fc-домены, содержащие эти общие структурные схемы и их варианты, могут характеризоваться измененным связыванием с Fc-рецептором, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

Варианты последовательности

[00174] Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых получены отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получены из любых иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначены как «мутации зародышевой линии»). Специалист средней квалификации в данной области техники, беря за основу раскрытые в данном документе последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все из каркасных остатков и/или остатков CDR в доменах V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой исходно получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации с получением исходной последовательности зародышевой линии, например, мутации подвергнуты только остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в

пределах последних 8 аминокислот FR4, или мутации подвергнуты только остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR подвергают мутации в соответствующий(-е) остаток(-ки) последовательности другой зародышевой линии (*m. e.* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно получено антитело).

[00175] Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, *например*, где определенные отдельные остатки подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка из конкретной последовательности зародышевой линии, при этом определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации с получением соответствующего остатка из другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. д. Настоящее изобретение также охватывает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных с помощью этого общего способа.

pH-зависимое связывание

[00176] Настоящее изобретение включает антитела к CD38, антитела к CD28 и биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28 с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело к CD38 по настоящему изобретению может характеризоваться пониженным связыванием с CD38 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В качестве альтернативы, антитела к CD38 по настоящему изобретению могут характеризоваться повышенным связыванием с CD38 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает

значения pH, составляющие менее приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. Используемое в данном документе выражение «нейтральный pH» означает pH, составляющий от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный pH» включает значения pH, составляющие приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[00177] В некоторых случаях «сниженное связывание ... при кислом pH по сравнению со связыванием при нейтральном pH» выражают в виде отношения значения K_D связывания антитела с его антигеном при кислом pH к значению K_D связывания антитела с его антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как характеризующиеся «пониженным связыванием с CD38 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH» для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются соотношением K_D при кислом/нейтральном pH, составляющим приблизительно 3,0 или больше. В определенных иллюстративных вариантах осуществления соотношение K_D при кислом/нейтральном pH для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или больше.

[00178] Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получить, например, путем скрининга группы антител в отношении сниженного (или усиленного) связывания с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в пределах CDR) на остаток гистидина можно получить антитело со сниженной антигенсвязывающей способностью при кислом pH по сравнению с нейтральным pH.

Антитела, содержащие варианты Fc

[00179]В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к CD38, антитела к CD28 и биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, содержащие одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, *например*, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, где мутация(-и) повышает(-ют) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00180]Например, настоящее изобретение включает антитела к CD38, антитела к CD28 и биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в

Fc-домене и другие мутации в пределах вариабельных доменов антител, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул

[00181] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD38 и/или CD28 человека с высокой аффинностью (*например*, при значениях K_D на наномолярном и субнаномолярном уровне).

[00182] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител и биспецифические антитела, которые связывают CD38 человека (*например*, при температуре 25°C) с K_D , составляющей менее чем приблизительно 10 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD38 с K_D , составляющей менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ или менее чем приблизительно 25 пМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа.

[00183] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител и биспецифические антитела, которые связывают CD28 человека (*например*, при

температуре 25°C) с К_D, составляющей менее чем приблизительно 26 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD28 с К_D, составляющей менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ или менее чем приблизительно 25 пМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD38 с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 8 минут или более чем приблизительно 15 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD38 с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 3 минут, более чем приблизительно 4 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 110 минут или более чем приблизительно 120 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного

резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа. Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые связывают CD38 с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 10 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа.

[00184] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD28 с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 5 минут или более чем приблизительно 18 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD28 с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 3 минут, более чем приблизительно 4 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 40 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 110 минут или более чем приблизительно 120 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или практически аналогичного анализа. Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые связывают CD38 с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 10 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, *например*, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в данном документе, или

практически аналогичного анализа.

[00185] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с клеточными линиями человека, которые экспрессируют эндогенный CD38 (например, опухолевыми клетками NCI-H929, MOLP-8 или WSU-DLCL2), как определено при исследованиях ксеногенных опухолей *in vivo*, представленных в примерах 9-14, или в практически аналогичном анализе.

[00186] Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, которые проявляют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (a) подавления опухолевого роста у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы человека; (b) супрессии опухолевого роста сформировавшихся опухолей у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы человека (см., например, примеры 9-14), и (c) супрессии опухолевого роста сингенных клеток меланомы, сконструированных для экспрессии CD38 человека у иммунокомпетентных мышей.

[00187] Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с CD38 человека и CD28 человека. Степень, с которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD38 и/или CD28, можно оценить посредством сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[00188] Например, настоящее изобретение включает антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые специфически связываются с линиями Т-клеток человека, которые экспрессируют CD38, но не экспрессируют CD28, и/или клетками, экспрессирующими BCMA.

[00189] Например, настоящее изобретение включает антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD38 и/или CD28 человека и индуцируют активацию Т-клеток.

[00190] Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, которые способны истощать или снижать популяцию клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, у субъекта (*см., например, примеры 9-12 или практически аналогичный анализ*). Например, согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28, где однократное введение или несколько введений 0,04 мг/кг, 0,4 мг/кг или 4 мг/кг биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту вызывает снижение количества CD38-экспрессирующих клеток у субъекта (*например, опухолевый рост у субъекта супрессируется или подавляется*).

Эпитопное картирование и родственные технологии

[00191] Эпитоп на CD38 и/или CD28, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (*например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более*) аминокислот белка CD38 или CD28. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD38 или CD28.

[00192] Используемый в данном документе термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может содержать более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными зонами на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуют аминокислоты из разных сегментов линейной полипептидной цепи, располагающиеся рядом в пространстве. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы в антигене.

[00193] Разные методики, известные специалистам средней квалификации в данной области техники, можно использовать для определения «взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами» в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, *например*, традиционный анализ перекрестного блокирования, такой как описан в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ на основе пептидного блоттинга (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487–496). Другим способом, который можно использовать для идентификации в пределах полипептида аминокислот, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить осуществление водородно-дейтериевого обмена по всем остаткам, за исключением защищенных антителом остатков (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и анализу посредством масс-спектрометрии, за счет чего выявляют меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252–259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A–265A. Для картирования эпитопа также можно использовать рентгеновскую кристаллографию комплекса антиген/антитело.

[00194] В данном документе предусмотрены антитела к CD38, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (*например*, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 1 в данном документе). Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела к

CD38, которые конкурируют за связывание с CD38 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (*например* антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 1 в данном документе).

[00195] В данном документе предусмотрены антитела к CD28, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (*например*, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 4 в данном документе). Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела к CD28, которые конкурируют за связывание с CD28 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (*например* антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 4 в данном документе).

[00196] Аналогичным образом, в данном документе предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28 человека, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD38 с любым из конкретных иллюстративных CD38-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD28 с любым из конкретных иллюстративных CD28-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

[00197] Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (*например*, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, или конкурирует с ней. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на CD38 (или CD28), что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, сначала обеспечивается возможность связывания эталонной биспецифической молекулы с белком CD38 (или

белком CD28). Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с молекулой CD38 (или CD28). Если тестируемое антитело способно связываться с CD38 (или CD28) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с эпитопом CD38 (или CD28), отличным от эпитопа, с которым связывается эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой CD38 (или CD28) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD38 (или CD28), что и эпитоп, связанный эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению. Затем можно провести дополнительные традиционные эксперименты (например, анализы с мутацией пептидов и анализы связывания) для того, чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, или что причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно проводить с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, *например*, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка подавляет связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы, считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, ослабляют или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка

имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только часть аминокислотных мутаций, которые ослабляют или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, ослабляют или устраняют связывание другого.

[00198]Для определения того, конкурирует ли антитело или антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанную выше методику связывания выполняют в двух направлениях. В первом направлении обеспечивается возможность связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с белком CD38 (или белком CD28) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD38 (или CD28). Во втором направлении обеспечивается возможность связывания тестируемого антитела с молекулой CD38 (или CD28) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD38 (или CD28). Если в обоих направлениях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна к связыванию с молекулой CD38 (или CD28), то делается заключение, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD38 (или CD28). Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно должно связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул

[00199]Антигенсвязывающие домены, специфические в отношении конкретных антигенов, можно получать с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфических в отношении двух разных антигенов (*например*, CD38 и CD28), можно соответствующим образом расположить относительно друг друга с получением биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с применением традиционных способов.

(Обсуждение иллюстративных форматов биспецифических антител, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, приведено в другом разделе в данном документе). В определенных вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (*например*, тяжелая и легкая цепи) полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно получить с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С применением технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител) первоначально выделяют химерные высокоаффинные антитела к конкретному антигену (*например*, CD38 или CD28), содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела подвергают анализу и отбирают по необходимым характеристикам, в том числе аффинности, селективности, эпитопу и т. д. Мышинные константные области заменяют необходимой человеческой константной областью для получения полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению.

[00200] Сконструированных с помощью генной инженерии животных можно использовать для получения человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, у которой отсутствует способность осуществлять реаранжировку и экспрессию эндогенной последовательности переменной области легкой цепи иммуноглобулина мыши, при этом мышь экспрессирует только один или два переменных домена человеческой легкой цепи, кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанные с геном мышиной константной области каппа-цепи в эндогенном локусе мышиной каппа-цепи. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две

разные тяжелые цепи, которые ассоциируют с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух различных генных сегментов вариабельной области человеческой легкой цепи. (См., например, US 2011/0195454). «Полностью человеческий» относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или домену иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из последовательности человека, по всей длине каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или домена иммуноглобулина. В некоторых случаях полностью человеческую последовательность получают из белка, эндогенного для человека. В других случаях полностью человеческий белок или белковая последовательность содержит химерную последовательность, где последовательность каждого компонента получена из человеческой последовательности. Без ограничения какой-либо теорией химерные белки или химерные последовательности, как правило, предназначены для сведения к минимуму образования иммуногенных эпитопов в местах соединения последовательностей компонентов, например, по сравнению с любыми областями или доменами человеческого иммуноглобулина дикого типа.

Биоэквиваленты

[00201] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей иллюстративных молекул, раскрытых в данном документе, но которые сохраняют способность связывать CD38 и/или CD28. Такие молекулы-варианты могут содержать одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

[00202] Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые являются биоэквивалентом любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, у

которых скорость и/или степень поглощения не демонстрирует значительного отличия при введении с одинаковой молярной дозой в сходных экспериментальных условиях, как в случае однократной дозы, так и в случае нескольких доз. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их поглощения, но не по скорости их поглощения, и все же могут считаться биоэквивалентами, поскольку такие отличия в скорости поглощения являются предусмотренными и отражены в листке-вкладыше, не являются необходимыми для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и считаются незначимыми с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[00203] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если отсутствуют клинически значимые отличия с точки зрения их безопасности, чистоты и эффективности.

[00204] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска возникновения нежелательных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

[00205] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[00206] Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения степени биоэквивалентности включают, например, (a) тест на человеке или других млекопитающих *in vivo*, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который

коррелировал с данными биодоступности у человека *in vivo* и с достаточной точностью предсказывал их; (с) тест на человеке и других млекопитающих *in vivo*, в котором соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

[00207] Варианты-биоэквиваленты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, можно сконструировать с помощью, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей, или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования при ренатурации внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые не являются необходимыми или являются неправильными. В других ситуациях антигенсвязывающие белки-биоэквиваленты могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, которые содержат аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и межвидовая перекрестная реактивность

[00208] Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека, но не с CD28 других видов. Также предусмотрены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD38 человека, но не с CD38 других видов. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и с CD38 одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD28 человека и с CD28 одного или более видов, отличных от человека.

[00209] Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD38 человека и/или CD28 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из CD38 и/или CD28 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе. Например, в конкретных иллюстративных вариантах осуществления раскрытого в данном документе, предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD38 человека и CD38 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28 человека, или биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD38 человека и CD38 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28 человека.

Составление и введение терапевтического препарата

[00210] В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т. п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания, США. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США), конъюгаты на основе ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло воде» и «вода в масле», эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. «Compendium of excipients for parenteral formulations»

PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00211] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера тела пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. При применении биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению для терапевтических целей у взрослого пациента, может оказаться выгодным внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, как правило, в разовой дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, путем периодического оценивания можно контролировать прогресс пациента, и соответствующим образом корректировать дозу. Более того, можно выполнять межвидовое масштабирование дозировок с применением способов, хорошо известных в данной области техники (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00212] Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429—4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и ее можно

вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

[00213] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению свободно можно применять устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена, и картридж опустошился, пустой картридж можно сразу удалить в отходы и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприца-ручки затем можно применять повторно. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприца-ручки сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприца-ручки предоставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения резервуара от фармацевтической композиции устройство помещается в отходы целиком.

[00214] При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые устройства для доставки по типу шприца-ручки и автоинъектора. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь некоторые из них. Примеры

одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, применяемых для подкожного введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс, США), при этом упомянуты лишь несколько из них.

[00215] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в виде системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно применять помпу (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления можно применять полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида, США. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, т. 2, стр. 115–138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527–1533.

[00216] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, для капельных инфузий и т. п. Эти инъекционные препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно применяемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций применяют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. п., которые можно применять в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например,

полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. п. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т. п., которые можно применять в комбинации с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. п. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

[00217] Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в виде лекарственных форм со стандартной дозой, подобранной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные составы (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму со стандартной дозой; в частности в форме инъекционного состава; в случае других лекарственных форм предпочтительно, чтобы содержание вышеупомянутого антитела составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг.

Пути терапевтического применения антигенсвязывающих молекул

[00218] В настоящем изобретении предусмотрены способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело к CD38, антитело к CD28 или их антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает CD38 и CD28. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, раскрытых в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Используемое в данном документе выражение «субъект, нуждающийся в этом» означает человека или отличное от человека животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков рака (*например*, субъекта, у которого имеется опухоль или который страдает от любого из типов рака, упомянутых в данном документе ниже) или которые иным образом получают пользу от подавления или снижения активности CD38 или

истощения популяции CD38⁺ клеток (*например*, клеток множественной миеломы).

[00219] Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению (и терапевтические композиции, содержащие их), применимы, *среди прочего*, для лечения любого заболевания или нарушения, при которых были бы полезны стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа. В частности, антитела к CD38, антитела к CD28 или биспецифические антигенсвязывающие молекулы к CD38 x CD28 по настоящему изобретению можно использовать для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью CD38 и/или BCMA или пролиферацией CD38⁺ и/или BCMA⁺ клеток, или опосредованного ими. Механизм действия, посредством которого достигаются терапевтические способы по настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих CD38, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза или посредством комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие CD38, которые можно подавлять или уничтожать с применением биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, включают, например, клетки множественной миеломы.

[00220] Антитела и антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению можно использовать для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией CD38, включая, например, множественную миелому, В-клеточный лейкоз, гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, меланому, аденокарциному протоков поджелудочной железы, глиому или рак молочной железы, или другой вид рака, частично характеризующегося наличием CD38⁺ клеток.

[00221] Согласно определенным вариантам осуществления антитела к CD38 x CD28, или антитела к CD38, или антитела к CD28 применимы для лечения опухолевых клеток, экспрессирующих, например, BCMA или CD20. Предусмотренные в данном документе антигенсвязывающие молекулы также можно использовать для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией BCMA, включая, *например*, рак, включая множественную миелому или другие виды рака В-клеток или плазматических клеток, такие как макроглобулинемия Вальденстрема, лимфома

Беркитта и диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантии, лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфоплазмочитарная лимфома и лимфома Ходжкина. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к CD38 x CD28, или антитела к CD38, или антитела к CD28 применимы для лечения пациента, пораженного множественной миеломой. В соответствии с другими связанными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы, включающие введение биспецифического антитела к CD38 x CD28, предусмотренного в данном документе, в комбинации с антителом к ВСМА, или с биспецифической антигенсвязывающей молекулой к ВСМА x CD3, или с биспецифической антигенсвязывающей молекулой к CD20 x CD3, как раскрыто в данном документе, пациенту, пораженному раковыми клетками, экспрессирующими ВСМА или CD20. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т. д., можно использовать для установления того, является ли пациент носителем множественной миеломы или другого рака В-клеточной линии дифференцировки.

[00222] Настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. Используемый в данном документе термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после лечения с помощью противораковой терапии.

[00223] Согласно определенным аспектам в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией CD38 (*например*, множественной миеломы), включающие введение одного или более из антител к CD38, антител к CD28 или биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в другом разделе в данном документе, субъекту после того, как было установлено, что у субъекта имеется множественная миелома. Например, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения множественной миеломы, включающие введение пациенту антитела к CD38, антитела к CD28 или биспецифической антигенсвязывающей молекулы к CD38 x CD28 через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2

месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект прошел другую иммунотерапию или химиотерапию.

Средства и составы для комбинированной терапии

[00224] В настоящем изобретении предусмотрены способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любые из иллюстративных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Иллюстративные дополнительные терапевтические средства, которые можно объединять или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, включают, *например*, противоопухолевое средство (*например* химиотерапевтические средства, включающие мелфалан, винкристин (Oncovin), циклофосфамид (Cytoksan), этопозид (VP-16), доксорубицин (Adriamycin), липосомальный доксорубицин (Doxil), обендамустин (Treanda) или любые другие известные тем, что являются эффективными при лечении опухоли из плазматических клеток у субъекта.). В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство включает стероиды. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство включает препараты для таргетной терапии, в том числе талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые являются средствами лечения, одобренными для лечения пациентов с недавно диагностированным заболеванием. Леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиносат, иксазомиб, элотузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического средства, эффективного для лечения рецидивирующей миеломы.

[00225] В некоторых вариантах осуществления вторым терапевтическим средством является биспецифическое антитело к BCMAxCD3. Иллюстративные биспецифические антитела к BCMAxCD3 раскрыты в U.S. 2020/0024356, включенной в данный документ посредством ссылки. Иллюстративное биспецифическое антитело к BCMAxCD3, раскрытое в U.S. 2020/0024356, представляет собой REGN5458, которое содержит связывающий домен к BCMA, имеющий HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 66/82, и связывающий домен к CD3, имеющий HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 90/82,

представленные в перечне последовательностей в U.S. 2020/0024356. В некоторых вариантах осуществления вторым терапевтическим средством является биспецифическое антитело к CD20хCD3. Иллюстративные биспецифические антитела к CD20хCD3 раскрыты в патенте США № 9657102, включенном в данный документ посредством ссылки. Иллюстративное биспецифическое антитело к CD20хCD3, раскрытое в патенте США № 9657102, представляет собой REGN1979, которое содержит связывающий домен к CD20, имеющий HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 1242/1258, и связывающий домен к CD3, имеющий HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 1250/1258, представленные в перечне последовательностей в патенте США № 9657102.

[00226] В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой схему лечения, предусматривающую лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой иммуномодулирующее средство. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой ингибитор протеасом, в том числе бортезомиб (Velcade), карфилзомиб (Kymprolis), иксазомиб (Ninlaro). В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Farydak). В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым средством, ингибитор контрольной точки или их комбинации. Другие средства, которые предпочтительно можно вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами по настоящему изобретению, включают ингибиторы цитокинов, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению (*например*, фармацевтические композиции, содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к CD38 х CD28, раскрытую в данном документе), также можно вводить как часть схемы терапии, включающей одну

или несколько терапевтических комбинаций, выбранных из моноклонального антитела, отличного от описанного в данном документе, которое может взаимодействовать с другим антигеном на поверхности плазматической клетки, биспецифического антитела, одно плечо которого связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки, а другое плечо связывается с антигеном на Т-клетке, конъюгата антитело-лекарственное средство, биспецифического антитела, конъюгированного с противоопухолевым средством, ингибитора контрольной точки, например, ингибитора, нацеленного на PD-1 или CTLA-4 или их комбинации. В определенных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda), ниволумаб (Opdivo) или цемиплимаб (REGN2810; см. ингибитор PD-1, представленный в патенте США № 9987500, имеющий пару HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 162/170). В определенных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio) или дурвалумаб (Imfinzi)). В определенных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов CTLA-4, таких как ипилимумаб (Yervoy). Другие комбинации, которые можно использовать вместе с антителом по настоящему изобретению, описаны выше.

[00227] Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, siRNA, пептитело, нанотело или фрагмент антитела (*например*, Fab-фрагмент; F(ab')₂-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; dAb-фрагмент; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетраатела, мини-тела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками,

анальгетиками, кортикостероидами и/или NSAID. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или стандартную химиотерапию.

[00228]Дополнительный терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить непосредственно перед введением антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, одновременно с ней или вскоре после ее введения (для целей настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[00229]Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению составляют совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, описанных в других местах в данном документе.

Схемы введения

[00230]Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить несколько доз антигенсвязывающей молекулы (*например*, антитела к CD38, антитела к CD28 или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает CD38 и CD28) в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту нескольких доз антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Используемое в данном документе «последовательное введение» означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в отдельный момент времени, *например*, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (*например*, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, а затем одной или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы, и необязательно затем одной или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

[00231] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называется «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (*например*, при необходимости корректируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале режима лечения как «нагрузочные дозы», а затем последующие дозы вводятся с меньшей частотой (*например*, «поддерживающие дозы»).

[00232] В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (*например*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает, в контексте последовательности из нескольких введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

[00233] Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (*например*, антитела к CD38, антитела к CD28 или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает CD38 и CD28). *Например*, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят

только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

[00234] В вариантах осуществления, включающих несколько вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1–2 недели после введения непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом в вариантах осуществления, включающих несколько третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2–4 недели после введения непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться на протяжении схемы лечения. Врач может корректировать частоту введения в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Пути применения антител в диагностике

[00235] Антитела к CD38, раскрытые в данном документе, можно использовать для обнаружения и/или измерения CD38 или CD38-экспрессирующих клеток в образце, *например*, для диагностических целей. Например, антитело к CD38 или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующихся aberrантной экспрессией (*например*, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. д.) CD38. Иллюстративные диагностические анализы на CD38 могут предусматривать, *например*, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом к CD38, раскрытым в данном документе, при этом антитело к CD38 мечено поддающейся обнаружению меткой или репортерной молекулой. Альтернативно, немеченое антитело к CD38 можно применять в диагностических путях применения в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является меченым обнаруживаемой меткой.

Обнаруживаемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другое иллюстративное диагностическое применение антител к CD38 по настоящему изобретению включает антитела, меченные ^{89}Zr , например меченные ^{89}Zr -десфероксамином, для целей неинвазивной идентификации и отслеживания опухолевых клеток в организме субъекта (*например* посредством визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET)). (См., например, Tavaré, R. et al. Cancer Res. 2016 Jan 1;76(1):73-82; and Azad, BB. et al. Oncotarget. 2016 Mar 15;7(11):12344-58.) Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для выявления или измерения содержания CD38 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[00236] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах в отношении CD38 согласно настоящему изобретению, включают образец любой ткани или жидкости, который можно получить от пациента и который содержит выявляемые количества белка CD38 или его фрагментов в нормальном или патологическом состояниях. Обычно для первоначального определения исходного или стандартного уровня CD38 будут измеряться уровни CD38 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированными с аномальными уровнями или активностью CD38). Данный исходный уровень CD38 затем можно сравнивать с уровнями CD38, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания или состояния, связанных с CD38 (*например*, опухоли, содержащей CD38-экспрессирующие клетки).

Устройства

[00237] Настоящее изобретение также предусматривает сосуд (*например*, флакон или хроматографическую колонку) или инъекционное устройство (*например*, шприц,

предварительно заполненный шприц или автоинъектор), содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (*например*, ее фармацевтический состав), представленную в данном документе. Сосуд или устройство для инъекций может быть упаковано в набор.

[00238] Устройство для инъекций представляет собой устройство, с помощью которого вводят вещество в организм субъекта (*например*, человека) парентеральным путем, *например*, внутриглазным, интравитреальным, внутримышечным, подкожным или внутривенным. Например, устройство для инъекций может представлять собой шприц (*например*, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как автоинъектор), который, например, содержит цилиндр или корпус для удержания жидкости для инъекции (*например*, содержащей антитело, или фрагмент, или фармацевтический состав на их основе), иглу для прокалывания кожи, кровеносных сосудов или другой ткани для инъекции жидкости; и поршень для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы в организм субъекта.

[00239] Фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению свободно можно применять устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена, и картридж опустошился, пустой картридж можно сразу удалить в отходы и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприца-ручки затем можно применять повторно. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприца-ручки сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприца-ручки предоставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения резервуара от фармацевтической композиции

устройство помещается в отходы целиком.

[00240] При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые устройства для доставки по типу шприца-ручки и автоинъектора. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, применяемых для подкожного введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс, США), при этом упомянуты лишь несколько из них.

[00241] В данном документе предусмотрены способы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, включающие введение, *например*, инъекцию молекулы в организм субъекта, *например*, с помощью устройства для инъекций.

Способы экспрессии

[00242] В данном документе предусмотрены рекомбинантные способы получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению или ее цепи иммуноглобулина, включающие (i) введение в клетку-хозяина одного или более полинуклеотидов, кодирующих легкую и/или тяжелую цепи иммуноглобулина такой

биспецифической антигенсвязывающей молекулы, например, где полинуклеотид находится в векторе, и/или встраивается в хромосому клетки-хозяина, и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (*например*, млекопитающего, гриба, яичника китайского хомячка (CHO), *Pichia* или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида, и (iii) необязательно выделение биспецифической антигенсвязывающей молекулы или цепи иммуноглобулина из клетки-хозяина или среды, в которой клетку-хозяина выращивают. Продукт такого способа также составляет часть настоящего изобретения наряду с его фармацевтической композицией.

[00243] В одном варианте осуществления способ получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы включает способ очистки молекулы, *например*, с помощью колоночной хроматографии, осаждения и/или фильтрации. Продукт такого способа также составляет часть настоящего изобретения наряду с его фармацевтической композицией.

[00244] Клетки-хозяева, содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению и/или полинуклеотид, кодирующий цепи иммуноглобулина такой молекулы (*например*, в векторе), также являются частью настоящего изобретения. Клетки-хозяева включают, например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), и клетки гриба, такие как клетки *Pichia* (*например*, *P. pastoris*).

ПРИМЕРЫ

[00245] Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности в используемых числах (*например*, количествах, температуре и т. п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то

части являются частями по весу, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

[00246] Контрольные антитела, использованные в примерах 9-12, включают CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D) и CD28-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (bsAb5671).

[00247] Два сигнала, «сигнал 1» и «сигнал 2», необходимы для правильной активации Т-клеток. «Сигнал 1» индуцируется путем связывания Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках со связанными с пептидом молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антигенпрезентирующих клетках (APC). «Сигнал 2» обеспечивается за счет взаимодействия костимулирующего рецептора CD28 на Т-клетках с его лигандами, кластером дифференцировки 80 или 86 (CD80/CD86), присутствующими на APC. Активация Т-клеток, т. е. «сигнал 1», может быть обеспечена при обработке биспецифическим антителом к опухолассоциированному антигену (ТАА)хCD3, таким как биспецифическое антитело к CD20хCD3 (bsAb1979) или биспецифическое антитело к ВСМАхCD3 (bsAb5458).

[00248] Упомянутые на всем протяжении антитела изотипического контроля включают IsoC-1, также обозначаемое как IgG4^{P-PVA}, изотипический контроль для биспецифического антитела к CD20хCD3 (bsAb1979), и IsoC-2, также обозначаемое как IgG4^P, изотипический контроль для цемиплимаба.

Пример 1. Получение антител к CD38 и антител к CD28

[00249] Антитела к CD38 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, клетками, экспрессирующими CD38, или ДНК, кодирующей CD38. Иммунный ответ антител отслеживали с помощью специфического в отношении CD38 иммуноанализа. После достижения требуемого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования

клеточных линий гибридом. Клеточные линии гибридом подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют CD38-специфические антитела. Посредством применения данной методики получали несколько химерных антител к CD38 (*т. е.* антител, имеющих вариабельные домены человека и константные домены мыши). В дополнение несколько полностью человеческих антител к CD38 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

[00250] Аналогичным образом антитела к CD28 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, клетками, экспрессирующими CD28, или ДНК, кодирующей CD28. Иммунный ответ антител отслеживали с помощью специфического в отношении CD28 иммуноанализа. После достижения требуемого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования клеточных линий гибридом. Клеточные линии гибридом подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют CD28-специфические антитела. Посредством применения данной методики получали несколько химерных антител к CD28 (*т. е.* антител, имеющих вариабельные домены человека и константные домены мыши). В дополнение несколько полностью человеческих антител к CD28 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

[00251] Антитела характеризовали и отбирали по необходимым характеристикам, в том числе аффинности, селективности и т. д. При необходимости константные области мыши заменяли требуемой константной областью человека, например дикого типа или модифицированной константной областью IgG1 или IgG4, для получения полностью человеческого антитела к CD38 или полностью человеческого антитела к CD28. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, в вариабельной области сохраняются характеристики связывания с антигеном с высокой аффинностью или специфичности к мишени.

[00252] Определенные биологические свойства иллюстративных антител к CD38 и антител к CD28, полученных в соответствии со способами из данного примера, и биспецифических антител, сконструированных на их основе, подробно описаны в примерах, представленных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепей антител к CD38.

[00253] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител к CD38 по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в таблице 2. Полные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи и легкой цепи представлены в таблице 3.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей к CD38

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb1	2	4	6	8	18	20	22	24
mAb2	32	34	36	38	48	50	52	54

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот к CD38

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb1	1	3	5	7	17	19	21	23
mAb2	31	33	35	37	47	49	51	53

Таблица 3. Идентификаторы последовательностей тяжелых цепей и легких цепей к CD38

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Аминокислоты HC	Аминокислоты LC	Нуклеиновая кислота HC	Нуклеиновая кислота LC
mAb1	26	30	25	29
mAb2	56	60	55	59

[00254] Антитела, предусмотренные в данном документе, могут быть любого изотипа. Например, антитела к CD38 по настоящему изобретению могут содержать последовательности переменного домена и CDR, представленные в таблицах 1 и 2, и человеческий Fc-домен изотипа IgG4, IgG1 и т. д. Для определенных путей применения или экспериментов Fc-домен может представлять собой Fc-домен мыши. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (*например*, антитело с Fc из IgG4 мыши можно превращать в антитело с Fc из IgG1 человека и т. д.), но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые

обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или практически аналогичными независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепей антител к CD28.

[00255] В таблице 4 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепей выбранных антител к CD28 по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в таблице 5. Полные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи и легкой цепи представлены в таблице 6.

Таблица 4. Идентификаторы аминокислотных последовательностей к CD28

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb3	10	12	14	16	18	20	22	24
mAb4	40	42	44	46	48	50	52	54

Таблица 5. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот к CD28

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb3	9	11	13	15	17	19	21	23
mAb4	39	41	43	45	47	49	51	53

Таблица 6. Идентификаторы последовательностей тяжелых цепей и легких цепей к CD28

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Аминокислоты HC	Аминокислоты LC	Нуклеиновая кислота HC	Нуклеиновая кислота LC
mAb3	28	30	27	29
mAb4	58	60	57	59

[00256] Антитела по настоящему изобретению могут быть любого изотипа.

Например, антитела к CD28 по настоящему изобретению могут содержать последовательности переменного домена и CDR, представленные в таблицах 4 и 5, и человеческий Fc-домен изотипа IgG4, IgG1 и т. д. Для определенных путей применения или экспериментов Fc-домен может представлять собой Fc-домен мыши. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (*например*, антитело с Fc из IgG4 мыши можно превращать в антитело с Fc из IgG1 человека и т. д.), но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые

обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 4 и 5, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или практически аналогичными независимо от природы Fc-домена.

Пример 4. Получение биспецифических антител, которые связывают CD38 и CD28

[00257] В данном документе предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD28 и CD38; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также обозначены в данном документе как “к CD38 х CD28”, или “к CD28 х CD38”, или “биспецифические молекулы к CD38 х CD28”, или “к CD38/CD28”, или “биспецифические молекулы CD38хCD28”, или “bsAb CD38хCD28”. Связывающая CD38 часть биспецифической молекулы к CD38 х CD28 применима для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют CD38, а связывающая CD28 часть биспецифической молекулы применима для активации Т-клеток. Одновременное связывание CD38 на опухолевой клетке и CD28 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (клеточный лизис) подвергаемой нацеливанию опухолевой клетки под действием активированной Т-клетки.

[00258] Биспецифические антитела, содержащие CD38-специфический связывающий домен и CD28-специфический связывающий домен, конструировали с применением стандартных методов, где тяжелую цепь и легкую цепь антитела к CD38 объединяли с тяжелой цепью антитела к CD28. В случае биспецифических антител молекулы конструировали с использованием тяжелой цепи из антитела к CD38, тяжелой цепи из антитела к CD28 и общей легкой цепи из антитела к CD38. В других случаях биспецифические антитела можно конструировать с использованием тяжелой цепи из антитела к CD28, тяжелой цепи из антитела к CD38 и легкой цепи антитела, которая, как известно, является «промискуитетной» или эффективно образует пару с множеством плеч тяжелых цепей.

[00259] Краткое описание составных частей антигенсвязывающих доменов различных биспецифических антител, полученных в соответствии с данным примером, представлено в таблице 7.

Таблица 7. Краткое описание компонентов биспецифических антител к CD38 x CD28

	CD38-связывающее плечо (D1)				CD28-связывающее плечо (D2)				Общая легкая цепь			
	SEQ ID NO:				SEQ ID NO:				SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
	mAb1				mAb3							
bsAb6031	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
	mAb2				mAb4							
bsAb7945	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54

Пример 5. Кинетика связывания антител к CD38 и антител к CD28 согласно Biacore

[00260] Исследования кинетики на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили для определения кинетических параметров связывания CD38 и CD28 с биспецифическими антителами к CD38xCD28..

[00261] Для определения кинетики CD38 проводили эксперименты на основе SPR с использованием прибора Biacore 3000 при температуре 25°C. Осуществляли захват антител в течение 37 секунд при скорости потока 8 мкл/мин на поверхности CM5, связанной с антителом к Fc человека (bsAb2567). Осуществляли захват примерно 230 RU каждого антитела. Мономерный CD38 человека с с-концевой меткой тус-тус-гексагистидин (hCD38.mmH, bsAb3305) в концентрациях 90, 30, 10, 3,33, 1,11 или 0,37 нМ вводили на эту поверхность в течение 5 минут при скорости потока 50 мкл/мин. Диссоциацию измеряли в течение 10 минут. K_D и $t_{1/2}$ рассчитывали путем подгонки сенсограмм с двумя контрольными источниками к модели связывания 1:1.

[00262] Для определения кинетики CD28 проводили эксперименты на основе SPR

с использованием прибора Biacore 3000 при температуре 25°C. Осуществляли захват димерного CD28 человека с с-концевой меткой мышинового Fc (hCD28.mFc, bsAb2012) в течение 37 секунд при скорости потока 8 мкл/мин на поверхности CM5, связанной с антителом к мышинному Fc-(GE). Осуществляли захват примерно 150 RU hCD28.mFc. Антитела к CD38хCD28 (bsAb7945 и bsAb6031) в концентрациях 90, 30, 10, 3,33, 1,11 или 0,37 нМ вводили на эту поверхность в течение 5 минут при скорости потока 50 мкл/мин. Диссоциацию измеряли в течение 10 минут. K_D и $t_{1/2}$ рассчитывали путем подгонки сенсограмм с двумя контрольными источниками к модели связывания 1:1.

[00263] Параметры кинетики связывания для связывания hCD38.mmH и hCD28.mFc с двумя разными биспецифическими антителами к CD38хCD28 по настоящему изобретению при температуре 25°C показаны в таблицах 8 и 9. Как показано в таблице 8, два биспецифических антитела связывают CD38 человека с KD, составляющей менее чем приблизительно 10 нМ; и согласно таблице 9, связывают CD28 человека с KD, составляющей менее чем приблизительно 26 нМ.

Таблица 8. Кинетика связывания hCD38.mmH с биспецифическими антителами к CD38 х CD28

	hCD38.mmH			
bsAb №	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
bsAb6031	1,06E+05	7,48E-04	7,08E-09	15,4
bsAb7945	9,57E+05	1,44E-03	1,50E-09	8,0

Таблица 9. Кинетика связывания hCD28.mFc с биспецифическими антителами к CD38 х CD28

	hCD28.mFc
--	-----------

bsAb №	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	$t_{1/2}$ (мин)
bsAb6031	5,74E+04	1,49E-03	2,59E-08	7,8
bsAb7945	1,78E+05	2,36E-03	1,33E-08	4,9

Пример 6. Активация Т-клеток биспецифическими антителами к CD38 x CD28 в присутствии клеток CD38+ HEK93 или клеток MOLP8, которые эндогенно экспрессируют ВСМА

[00264]Как упоминалось выше, два сигнала, «сигнал 1» и «сигнал 2», необходимы для правильной активации Т-клеток. «Сигнал 1» индуцируется путем связывания Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках со связанными с пептидом молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антигенпрезентирующих клетках (APC). «Сигнал 2» обеспечивается за счет взаимодействия костимулирующего рецептора CD28 на Т-клетках с его лигандами, кластером дифференцировки 80 или 86 (CD80/CD86), присутствующими на APC (Martin *et al.* A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. Journal of immunology, 1986; 136(9): 3282-7; June *et al.* T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. Molecular and cellular biology. 1987; 7(12): 4472-81; Harding *et al.* CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature. 1992;356(6370):607-9). Следовательно, активация передачи сигналов CD28 обеспечивает целенаправленный подход к усилению существующей передачи сигналов TCR.

[00265]Биспецифические антитела к CD38xCD28, предусмотренные в данном документе, были разработаны для имитации природных лигандов CD28 путем связывания CD38⁺ клеток-мишеней с CD28⁺ Т-клетками для обеспечения «сигнала 2» с целью усиления активации Т-клеток в присутствии «сигнала 1», обеспечиваемого с помощью биспецифического антитела к опухолеассоциированному антигену (ТАА) x

CD3 или аллогенного ответа, обеспечиваемого APC.

[00266]В этом примере оценивали способность биспецифических антител к CD38хCD28 активировать первичные Т-клетки человека путем вовлечения CD38 и CD28 для доставки «сигнала 2», определяемую по высвобождению IL2, высвобождению IFN γ и пролиферации Т-клеток, в присутствии линии клеток рака эмбриональной почки человека, сконструированной для экспрессии hCD20 и hCD38 (HEK293/hCD20/hCD38), с использованием bsAb1979 (CD20хCD3) в качестве «сигнала 1». Клетки HEK293, экспрессирующие только hCD20, включали в качестве контроля для измерения активности, которая может возникать в отсутствие CD38 на APC. Кроме того, клеточную линию множественной миеломы, которая эндогенно экспрессирует hCD38, MOLP8, включали в тестирование биспецифических антител к CD38хCD28. Поскольку клетки MOLP8 также эндогенно экспрессируют BCMA, bsAb5458 (BCMAхCD3) включали в качестве «сигнала 1». Следует отметить, что в отличие от клеток HEK293, клетки MOLP8 способны обеспечивать обнаруживаемую аллогенную стимуляцию Т-клеток, выступая в качестве «сигнала 1», в отсутствие стимуляции CD3, обеспечиваемой bsAb5458.

[00267]Выделение первичных CD3⁺ Т-клеток человека.

[00268]Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из пакета лейкоцитов здорового донора от Precision for Medicine (донор 555130) с использованием набора EasySepTM Direct Human PBMC Isolation Kit в соответствии с рекомендованным производителем протоколом и замораживали. CD3⁺ Т-клетки выделяли из размороженных PBMC с использованием набора EasySepTM Human CD3⁺ T Cell Isolation Kit от StemCell Technologies в соответствии с рекомендованными инструкциями производителя.

[00269]Анализ высвобождения IL2 и IFN γ .

[00270]Обогащенную популяцию CD3⁺ Т-клеток ресуспендировали в среде для стимулирования, добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1 х 10⁵ клеток/луночка. HEK293/hCD20/hCD38 или HEK293/hCD20 с остановленным ростом добавляли к CD3⁺ Т-клеткам в конечной концентрации 1 х 10⁴ клеток/луночка.

Клетки MOLP8 с остановленным ростом добавляли к CD3⁺ Т-клеткам в конечной концентрации 5×10^4 клеток/лунка. После добавления клеток в лунки, содержащие HEK293/hCD20/hCD38 или HEK293/hCD20, добавляли постоянную концентрацию 0,1 нМ bsAb1979 или его подходящего изотипического контроля (IsoC-1). Постоянную концентрацию 0,5 нМ bsAb5458 или IsoC-1 добавляли в лунки, содержащие клетки MOLP8. Затем bsAb6031, bsAb7945 и IsoC-1 титровали от 3 пМ до 200 нМ в разведении 1:4 и добавляли в лунки. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала оттитрованных антител. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C, 5% CO₂ и всего 5 μ л супернатанта извлекали и использовали для измерения IL2. Через 72 часа всего 45 μ л супернатанта извлекали и 5 μ л использовали для измерения IFN γ . Количество цитокина в супернатанте для анализа определяли с использованием наборов AlphaLisa от PerkinElmer в соответствии с протоколом производителя. Измерения цитокинов получили с помощью многоканального спектрофотометра для прочтения планшетов Perkin Elmer Envision, и значения представили как пг/мл. Все серийные разведения исследовали в двух повторностях.

[00271]Значения EC₅₀ для антител определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ с применением программного обеспечения GraphPad PrismTM. Максимальное значение для IL2 и IFN γ получают как средний максимальный ответ, обнаруженный в диапазоне исследуемых доз.

[00272]Анализ пролиферации Т-клеток.

[00273]После окончательного извлечения супернатанта через 72 часа в лунки добавляли 0,25 μ Ки/лунка тимидина, содержащего тритий, и планшеты инкубировали в течение 6 часов. Тимидин и, следовательно, тритий будут в больших количествах встраиваться во вновь синтезированную ДНК делящихся клеток. После 6-часовой инкубации клетки собирали на 96-луночные планшеты UniFilter и в каждую лунку добавляли 30 мкг сцинтилляционного раствора. Встраивание трития измеряли в количестве импульсов в минуту (CPM) с применением прибора Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT. Все серийные разведения исследовали в двух

повторностях.

[00274] Значения EC_{50} для антител определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ с применением программного обеспечения GraphPad Prism™. Максимальное значение СРМ получают как средний максимальный ответ, обнаруженный в диапазоне исследуемых доз.

Результаты.

HEK293/hCD20 и HEK293/hCD20/hCD38

[00275] В присутствии мишени и «сигнала 1», обеспечиваемого bsAb1979, обработка антителами к CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) приводила к более высокому цитокиновому и пролиферативному ответу по сравнению с их соответствующим изотипическим контролем, IsoC-1. Однако в отсутствие мишени или «сигнала 1» обработка антителами к CD38хCD28 не усиливала высвобождение цитокинов из Т-клеток или их пролиферацию. См. таблицы 10, 11 и 12.

MOLP8

[00276] В присутствии аллогенных клеток MOLP8 и в отсутствие bsAb5458 обработка антителами к CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) по сравнению с соответствующим изотипическим контролем приводила к дозозависимому увеличению высвобождения IL2 и пролиферации. Хотя «сигнал 1» может обеспечиваться аллогенными клетками MOLP8, также оценивали добавление bsAb5458. В этих условиях обработка антителами к CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) приводила к дозозависимому увеличению высвобождения IL2 и высвобождения IFN γ по сравнению с соответствующим изотипическим контролем, IsoC-1. Поскольку пролиферация является чувствительным показателем, добавление bsAb5458 в отсутствие CD38хCD28 в комбинации с аллогенной стимуляцией, которую обеспечивают клетки MOLP8, приводит к насыщению сигналов для пролиферации, предотвращая обнаружение влияния CD38хCD28. См. таблицы 10, 11 и 12.

[00277] Таким образом, в присутствии «сигнала 1» биспецифические антитела к

CD38хCD28 активируют первичные Т-клетки человека, доставляя «сигнал 2», что определяется дозозависимым увеличением высвобождения IL2, высвобождения IFN γ и пролиферации Т-клеток.

Таблица 10. Максимальное высвобождение IL2 и значения активности антител

	HEK293/hCD20/h CD38		HEK293/hCD20		MOLP8	
	MAX (пг/мл)	EC ₅₀ [M]	MAX (пг/мл)	EC ₅₀ [M]	MAX (пг/мл)	EC ₅₀ [M]
bsAb6031 + TAAxCD3	1642	1,99E-10	48,01	ND	5864	1,02E-09
bsAb6031 + IgG4 ^P	1	ND	1	ND	2821	6,53E-10
bsAb7945 + TAAxCD3	3878	5,02E-12	416,4	NC	9109	NC
bsAb7945 + IgG4 ^P	143,7	4,14E-08	48,85	NC	4880	9,71E-12
IgG4 ^{P-PVA} + TAAxCD3	7,221	ND	32,16	ND	152,3	ND
IgG4 ^{P-PVA} + IgG4 ^P	1	ND	1	ND	715,1	ND

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Таблица 11. Максимальное высвобождение IFN γ и значения активности антител

	HEK293/hCD20/h CD38		HEK293/hCD20		MOLP8	
	MAX	EC ₅₀ [M]	MAX	EC ₅₀	MAX	EC ₅₀ [M]
Антитела						

	(пг/мл)		(пг/мл)	[M]	(пг/мл)	
bsAb6031 + TAAxCD3	1306	2,94E-10	1	ND	1578	7,48E-10
bsAb6031 + IgG4 ^P	1	ND	1	ND	40,66	NC
bsAb7945 + TAAxCD3	3120	1,23E-10	226,1	NC	1759	4,24E-12
bsAb7945 + IgG4 ^P	1	ND	1	ND	90,52	NC
IgG4 ^{P-PVA} + TAAxCD3	1	ND	1	ND	1	ND
IgG4 ^{P-PVA} + IgG4 ^P	1	ND	1	ND	715,1	ND

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Таблица 12. Максимальная пролиферация и значения активности антител

	HEK293/hCD20/h CD38		HEK293/hCD20		MOLP8	
Антитела	MAX (CPM)	EC₅₀ [M]	MAX (CPM)	EC₅₀ [M]	MAX (CPM)	EC₅₀ [M]
bsAb6031 + TAAxCD3	5543	1,43E-1 0	2390	ND	6264	ND
bsAb6031 + IgG4 ^P	86,5	ND	97	ND	1269	4,67E-10
bsAb7945 + TAAxCD3	6627	8,94E-1 3	4162	NC	6682	ND

bsAb7945 + IgG4 ^P	998	4,56E-0 8	245	ND	2369	NC
IgG4 ^{P-PVA} + TAAxCD3	842	ND	1825	ND	5446	ND
IgG4 ^{P-PVA} + IgG4 ^P	112,5	ND	74	ND	818,5	ND

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Пример 7. Определение характеристик биспецифических антител к CD38xCD28 в комбинации с цемиплимабом

[00278]Как упоминалось выше, биспецифические антитела CD38xCD28 были разработаны для имитации природных лигандов CD28 путем связывания CD38⁺ клеток-мишеней с CD28⁺ Т-клетками для обеспечения костимулирующего «сигнала 2» с целью усиления активации Т-клеток в присутствии имеющегося «сигнала 1». В этом случае распознавание Т-клетками чужеродных детерминант на линии опухолевых клеток, NALM-6, приводит к аллогенному ответу, обеспечивающему «сигнал 1». В дополнение к костимулирующим сигналам также существуют ингибирующие сигналы, которые снижают активность Т-клеток. Лигирование рецептора белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1) на Т-клетках с его лигандом PD-L1 на APC приводит к привлечению фосфатаз к CD28 и TCR-комплексу (Zou and Chen, Inhibitory B7-family molecules in the tumor microenvironment. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 467-477; Francisco *et al.*, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; 236: 219-242; Hui *et al.*, T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017;355(6332): 1428-33), что, в свою очередь, противодействует передаче сигналов TCR и стимуляции CD28. Блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1 с помощью антагонистического антитела цемиплимаба в комбинации с биспецифическими антителами к CD38xCD28 может усиливать функцию Т-клеток и способствовать уничтожению клеток-мишеней, например, при раке.

[00279]В этом примере оценивали способность биспецифических антител к CD38хCD28 активировать первичные Т-клетки человека путем вовлечения CD38 и CD28 для доставки «сигнала 2», определяемую по высвобождению IL2 и IFN γ , в присутствии линии CD38⁺ клеток рака острого лимфобластного лейкоза человека, сконструированной для экспрессии PD-L1 (NALM-6/hPD-L1). Клетки NALM-6 обеспечивают аллогенный ответ TCR, достаточный для того, чтобы служить «сигналом 1». Также оценивали добавление фиксированной концентрации антитела-антагониста PD-1, цемиплимаба.

[00280]Выделение первичных CD3⁺ Т-клеток человека.

[00281]Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из пакета лейкоцитов здорового донора от Precision for Medicine (донор 555192) с использованием набора EasySep™ Direct Human PBMC Isolation Kit в соответствии с рекомендованным производителем протоколом и замораживали. CD3⁺ Т-клетки выделяли путем оттаивания флаконов с замороженными PBMC. Донорские PBMC обогащали CD3⁺ Т-клетками с использованием набора EasySep™ Human CD3⁺ T Cell Isolation Kit от StemCell Technologies в соответствии с рекомендованными инструкциями производителя.

[00282]Анализ высвобождения IL2 и IFN γ :

[00283]Обогащенную популяцию CD3⁺ Т-клеток ресуспендировали в среде для стимулирования, добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты в концентрации 1 х 10⁵ клеток/лунка. Клетки NALM-6 или клетки NALM-6, сконструированные для экспрессии hPD-L1, добавляли к CD3⁺ Т-клеткам в конечной концентрации 5 х 10⁴ клеток/лунка. Затем bsAb6031, bsAb7945 и Non-TAАхCD28 титровали от 0,76 пМ до 50 нМ в разведении 1:4 и добавляли в лунки. Конечная точка 10-точечного разведения не содержала оттитрованных антител. После добавления титрованного антитела в лунки добавляли постоянную концентрацию 20 нМ либо цемиплимаба, либо его соответствующего изотипического контроля (IsoC-2). Планшеты инкубировали в течение 72 часов при температуре 37°C, 5% CO₂ и 50 μ л общего супернатанта извлекали и 5 μ л из собранного супернатанта использовали для измерения IL2 и IFN γ .

Количество цитокина в супернатанте для анализа определяли с использованием наборов AlphaLisa от PerkinElmer в соответствии с протоколом производителя. Измерения цитокинов получили с помощью многоканального спектрофотометра для прочтения планшетов Perkin Elmer Envision, и значения представили как пг/мл. Все серийные разведения исследовали в трех повторностях.

[00284] Значения EC_{50} для антител определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ с применением программного обеспечения GraphPad PrismTM. Максимальное значение для цитокина получают как средний максимальный ответ, обнаруженный в диапазоне исследуемых доз.

Результаты.

[00285] В присутствии аллогенных клеток NALM-6 или клеток NALM-6, сконструированных для экспрессии PD-L1, обработка антителами к CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) по сравнению с соответствующим изотипическим контролем (IsoC-1) приводила к дозозависимому увеличению высвобождения IL-2. Максимальное высвобождение IL-2 было ниже в условиях с клетками NALM-6/PD-L1 по сравнению с NALM-6 (не экспрессирующими PD-L1). Добавление цемиплимаба не влияло на высвобождение IL-2 в условиях с клетками NALM-6, не экспрессирующими PD-L1. Однако в присутствии клеток NALM-6, экспрессирующих PD-L1, максимальное высвобождение IL-2 увеличивалось при добавлении цемиплимаба по сравнению с высвобождением IL-2 при добавлении соответствующего изотипического контроля для цемиплимаба, IsoC-2, свидетельствуя о том, что блокирование взаимодействия PD-1 с PD-L1 может усиливать функцию Т-клеток.

[00286] Таким образом, при наличии аллогенного ответа TCR, обеспечиваемого CD38⁺ клетками NALM-6/hPD-L1, достаточного для того, чтобы служить «сигналом 1», биспецифические антитела к CD38хCD28 активируют первичные Т-клетки человека, задействуя CD38 и CD28 для доставки «сигнала 2», что определяется по высвобождению IL2 и IFN γ .

Таблица 13. Максимальное высвобождение IL2 и значения активности антител

Антитела	NALM-6		NALM-6/hPD-L1	
	MAX (пг/мл)	EC₅₀ [M]	MAX (пг/мл)	EC₅₀ [M]
bsAb6031 + цемиплимаб	1216,28	2,44E-09	614,28	4,39E-09
bsAb6031 + IgG4 ^P	1219,58	1,68E-09	240,39	2,64E-09
bsAb7945 + цемиплимаб	3978,67	9,81E-11	2462,25	1,43E-10
bsAb7945 + IgG4 ^P	4204,95	1,33E-10	952,66	1,69E-10
Non-ТААхCD28 + цемиплимаб	134,53	ND	101,61	ND
Non-ТААхCD28 + IgG4 ^P	125,33	ND	31,52	ND

Сокращения. ND: не определено

Таблица 14. Максимальное высвобождение IFN γ и значения активности антител

Антитела	NALM-6		NALM-6/hPD-L1	
	MAX (пг/мл)	EC₅₀ [M]	MAX (пг/мл)	EC₅₀ [M]
bsAb6031 + цемиплимаб	380,19	NC	1,00	NC
bsAb6031 + IgG4 ^P	288,95	NC	1,00	NC
bsAb7945 + цемиплимаб	1619,64	NC	1239,90	NC
bsAb7945 + IgG4 ^P	1649,24	NC	701,11	NC
Non-ТААхCD28 + цемиплимаб	332,72	ND	14,07	ND

Non-TAAxCD28 + IgG4 ^P	85,64	ND	1,00	ND
----------------------------------	-------	----	------	----

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Пример 8. Биспецифическое антитело к CD38xCD28 на клетках-мишенях, экспрессирующих ВСМА и CD38, с PBMC человека

[00287] Обеспечиваемое CD38xCD28 усиление нацеливаемого ВСМАxCD3 уничтожения оценивали в 96-часовом анализе цитотоксичности, нацеленной на клетки H929 (линия CD38+ клеток множественной миеломы). Вкратце, PBMC человека высевали в среду RPMI с добавками из расчета 1×10^6 клеток/мл и инкубировали на протяжении ночи при температуре 37°C для обогащения лимфоцитами за счет истощения популяции прикрепляющихся макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки H929 метили с помощью 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CFDA-SE, а не подвергавшиеся воздействию PBMC с истощением прикрепляющихся клеток метили с помощью 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя CellTrace Violet. Меченые клетки-мишени и PBMC (соотношение эффектор/клетка-мишень 4:1) совместно инкубировали с серийными разведениями биспецифических антител к CD38xCD28 bsAb6031 или bsAb7945 (диапазон концентраций: от 33 нМ до 0,71 пМ) либо с фиксированной концентрацией 30 пМ ВСМАxCD3 (bsAb5458) или IgG4^{P-PVA} изотипического контроля H4sH10154P3. Также были включены лунки с ВСМАxCD3 или IgG4^{P-PVA}. После инкубации в течение 96 часов при температуре 37°C клетки собирали с планшетов и анализировали с помощью FACS на FACS BD LSRFortessa-X20. После извлечения супернатанта для анализа цитокинов клетки промывали холодным PBS и окрашивали красителем LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain для идентификации жизнеспособных клеток. Для оценки уничтожения NCI-H929 клетки гейтировали по популяциям, меченым Violet. Процент живой популяции регистрировали и использовали для расчета выживаемости. Процент жизнеспособности нормализовали до контрольных условий (клетки-мишени в присутствии только PBMC).

[00288] Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD4, CD8 и CD25. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD25 на CD2+/CD4+ или CD2+/CD8+ Т-клетках была представлена как мера активации Т-клеток. Кроме того, по мере пролиферации Т-клеток CellTraceViolet разбавляется, что приводит к снижению MFI, измеренному с помощью FACS. Таким образом, пролиферацию Т-клеток выражали как уменьшение MFI CellTraceViolet на CD2+/CD4+ или CD2+/CD8+ Т-клетках.

[00289] Супернатанты этого анализа собирали для анализа уровней цитокинов. Концентрации IL-17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 и IL-2 анализировали с использованием набора Cytometric Bead Array (CBA) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни цитокинов интерполировали из кривых, полученных с помощью стандартов набора, и выражали как пг/мл. Значения EC50 для уничтожения клеток-мишеней, активации Т-клеток, пролиферации и уровней цитокинов, а также максимальные уровни цитокинов рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении Prism.

Результаты.

[00290] Костимулирующие биспецифические антитела к CD38xCD28 bsAb6031 и bsAb7954 тестировали на их способность усиливать уничтожение клеток-мишеней H929 и активацию Т-клеток, опосредованные биспецифическим антителом к BCMAxCD3 bsAb5458. Кроме того, bsAb6031 и bsAb7954 оценивали на способность опосредовать активацию клеток-мишеней и Т-клеток в присутствии нестимулирующего изотипического контроля.

- bsAb6031 и bsAb7954 усиливали цитотоксичность, опосредованную 30 пМ BCMAxCD3, у двух протестированных доноров со средним значением EC50, составляющим 5,2 нМ и 0,24 нМ соответственно, со средним процентным увеличением максимальной цитотоксичности на 64% и 93% соответственно по сравнению с цитотоксичностью в присутствии только 30 пМ BCMAxCD3. В присутствии 30 пМ изотипического контроля bsAb6031 и bsAb7954 опосредовали умеренную

цитотоксичность со средним увеличением на 4% и 5% соответственно по сравнению только с 30 пМ изотипического контроля (таблица 15, фигура 1).

- Наблюдаемый лизис клеток-мишеней был ассоциирован с активацией Т-клеток, измеренной по увеличению экспрессии CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. bsAb6031 и bsAb7954 усиливали активацию CD4 Т-клеток, опосредованную 30 пМ BCMAxCD3, у двух протестированных доноров со средним значением EC50, составляющим 3,1 нМ и 0,20 нМ соответственно, со средним кратным увеличением максимальной MFI CD25 в 10 раз и 50 раз соответственно по сравнению с MFI CD25 в присутствии только 30 пМ BCMAxCD3. bsAb6031 и bsAb7954 усиливали активацию CD8 Т-клеток, опосредованную 30 пМ BCMAxCD3, у двух протестированных доноров со средним значением EC50, составляющим 2,3 нМ и 0,24 нМ соответственно, со средним кратным увеличением максимального MFI CD25 в 5 раз и 8 раз соответственно по сравнению с MFI CD25 в присутствии только 30 пМ BCMAxCD3. В присутствии 30 пМ изотипического контроля bsAb6031 и bsAb7954 опосредовали умеренную активацию CD4⁺ Т-клеток (в 5 раз и 8 раз соответственно) и активацию CD8⁺ Т-клеток (в 6,5 раз и 10 раз соответственно) по сравнению только с 30 пМ изотипического контроля. Значения EC50 получить не удалось (таблица 16, фигура 2).

- Наблюдаемый лизис клеток-мишеней был ассоциирован с пролиферацией Т-клеток, измеренной путем разбавления красителя пролиферации CellTrace violet в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. bsAb6031 усиливало пролиферацию CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток, опосредованную 30 пМ BCMAxCD3, у одного из двух протестированных доноров. bsAb7954 усиливало пролиферацию CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток, опосредованную 30 пМ BCMAxCD3, у двух протестированных доноров со средним значением EC50, составляющим 0,59 нМ и 0,41 нМ соответственно, со средним процентным увеличением пролиферации в 62 раза и 69 раз соответственно по сравнению с пролиферацией, опосредованной только 30 пМ BCMAxCD3.

bsAb6031 и bsAb7945 не индуцировали пролиферацию CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в присутствии 30 пМ изотипического контроля (таблица 17, фигура 3).

• Высвобождение цитокинов, опосредованное 30 пМ BCMAxCD3, усиливалось в присутствии bsAb6031 и bsAb7945. В частности, bsAb6031 увеличивало максимальные концентрации IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10 и TNF α в 2-7 раз по сравнению с 30 пМ BCMAxCD3, однако значения EC₅₀ рассчитать не удалось. В присутствии 30 пМ изотипического контроля bsAb6031 увеличивало концентрации IFN γ и TNF α в 2 раза по сравнению только с 30 пМ изотипического контроля. bsAb7954 увеличивало концентрации IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10 и TNF α в 2-13 раз при максимальной концентрации bsAb7954, при этом значения EC₅₀, когда их можно было рассчитать, составляли 0,21 нМ-1,5 нМ. (Таблица 18, фигура 4).

[00291] Таким образом, костимуляция повышала эффективность целенаправленно воздействующей цитотоксичности, активации Т-клеток и высвобождения цитокинов по сравнению с тем, что наблюдалось при использовании только BCMAxCD3.

Таблица 15. Значения EC₅₀ для цитотоксичности с мишенями H929

	Цитотоксичность			
	Донор 1		Донор 2	
	EC ₅₀ [M]	Максимальный % повышения	EC ₅₀ [M]	Максимальный % повышения
bsAb6031 + TAAxCD3	5,37E-09	92	4,95E-09	35
bsAb7945 + TAAxCD3	2,86E-10	94	1,87E-10	92
bsAb6031 + IgG4 ^{P-PVA}	ND	5	ND	3

bsAb7945				
+	ND	0	NC	11
IgG4 ^{P-PVA}				

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

% повышения: $100 * ((\% \text{ выживаемости}_{(SO)} - \% \text{ выживаемости}_{(SC)}) / \% \text{ выживаемости MFI}_{(SO)})$

Где “SO” представляет собой только 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} и “SC” представляет собой 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} с костимуляцией CD38xCD28 в самой высокой концентрации.

Таблица 16. Значения EC50 для активации Т-клеток (повышения активности CD25)

	Активация CD4 Т-клеток				Активация CD8 Т-клеток			
	Донор 1		Донор 2		Донор 1		Донор 2	
	EC ₅₀ [M]	Кратность максимального значения (MFI)	EC ₅₀ [M]	Кратность максимального значения (MFI)	EC ₅₀ [M]	Кратность максимального значения (MFI)	EC ₅₀ [M]	Кратность максимального значения (MFI)
bsAb6031 + TAAx CD3	5,22E-09	9	1,06E-09	11	3,63E-09	6	9,86E-10	4
bsAb7945 + TAAx	2,03E-10	11	1,97E-10	89	2,93E-10	6	1,78E-10	10

CD3								
bsAb6 031 + IgG4 ^P - PVA	ND	1	ND	0	ND	0	ND	13
bsAb7 945 + IgG4 ^P - PVA	ND	3	4,59E -10	11	ND	1	NC	19

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Кратность максимального значения: $CD25 \text{ MFI}_{(SC)} / CD25 \text{ MFI}_{(SO)}$

Где “SO” представляет собой только 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} и “SC” представляет собой 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} с костимуляцией CD38xCD28 в самой высокой концентрации.

Таблица 17. Значения EC50 для пролиферации Т-клеток (разбавление CellTrace Violet)

	Пролиферация CD4 Т-клеток				Пролиферация CD8 Т-клеток			
	Донор 1		Донор 2		Донор 1		Донор 2	
	EC ₅₀ [M]	% повыше ния	EC ₅₀ [M]	% повыше ния	EC ₅₀ [M]	% повыше ния	EC ₅₀ [M]	% повыше ния
bsAb60 31 + TAAxC D3	NC	56	ND	0	5,67E- 09	56	ND	5
bsAb79 45 +	5,67E- 10	70	6,20E- 10	54	4,96E- 10	64	3,25E- 10	74

TAAxC D3								
bsAb60 31 + IgG4 ^{P-P} VA	ND	1	ND	-2	ND	1	ND	8
bsAb79 45 + IgG4 ^{P-P} VA	ND	1	ND	0	ND	0	ND	-14

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

% повышения: $100 * ((\text{CellTraceViolet MFI}_{(\text{SO})} - \text{CellTraceViolet MFI}_{(\text{SC})}) / \text{CellTraceViolet MFI}_{(\text{SO})})$

Где “SO” представляет собой только 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} и “SC” представляет собой 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} с костимуляцией CD38xCD28 в самой высокой концентрации.

Таблица 18. Цитокины в супернатанте при анализе цитотоксичности H929 (только донор 1)

		bsAb6031 + TAAxCD3	bsAb7945 + TAAxCD3	bsAb6031 + IgG4 ^{P-PVA}	bsAb7945 + IgG4 ^{P-PVA}
IFN γ	EC50	NC	5,79E-10	NC	ND
	Максимальное значение	23	46	19	4
	Кратность максимального	3	10	4	1

	значения				
IL2	EC50	NC	4,37E-10	NC	ND
	Максимальное значение	20	27	12	11
	Кратность максимального значения	2	2	1	1
IL4	EC50	NC	1,58E-09	ND	ND
	Максимальное значение	17	21	10	10
	Кратность максимального значения	2	2	1	1
IL6	EC50	ND	ND	ND	ND
	Максимальное значение	39	30	18	14
	Кратность максимального значения	1	1	1	1
IL-10	EC50	ND	ND	ND	ND
	Максимальное значение	104	160	12	12
	Кратность максимального значения	7	13	1	1
TNFa	EC50	NC	2,11E-10	NC	ND
	Максимальное значение	128	201	26	25
	Кратность максимального значения	3	10	2	1

	значения				
IL17	EC50	ND	ND	ND	ND
	Максимальное значение	8	8	9	8
	Кратность максимального значения	1	1	1	1

Сокращения. ND: не определено; NC: не рассчитано, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Кратность максимального значения: Цитокин пг/мл_(SC)/Цитокин пг/мл_(SO)

Где “SO” представляет собой только 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} и “SC” представляет собой 30 пМ TAAxCD3 или 30 пМ IgG4^{P-PVA} с костимуляцией CD38xCD28 в самой высокой концентрации.

Пример 9. Эффективность *in vivo* биспецифических антител к CD38 x CD28 в комбинации с 4 мг/кг биспецифических антител к BCMA x CD3 в отношении роста опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8

[00292]Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 *in vivo* проводили исследование на ксеногенной опухоли. В день -13 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) (возраст 8-10 недель, Jackson Labs, № по кат. 005557) внутрибрюшинно вводили 4x10⁶ моноклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) от нормального здорового донора (Reach Bio, № по кат. 0500-301, лот №: 0160506). В день 0 мышам внутривенно вводили 2x10⁶ клеток опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8 (DSMZ, № по кат. ACC569), которые были сконструированы, чтобы также экспрессировать люциферазу светлячка (клетки MOLP-8-люциферазы). Затем мышам (n=5 в группе) немедленно вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D), либо bsAb BCMAxCD3 (bsAb5458) в количестве 4 мг/кг в комбинации с

CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля или bsAb CD38xCD28 (либо bsAb6031, либо bsAb7945) в количестве 4 мг/кг. Мышам вводили эти антитела еще дважды в дни 7 и 14, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 52 дней путем измерения биолуминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) вводили только клетки MOLP-8-люциферазы и PBMC, но не антитела (группа, обработанная PBS). Для измерения фоновых уровней BLI группа мышей (n=5) не подвергалась обработке и не получала опухоли, PBMC или антитела (группа без опухоли).

[00293] *Измерение роста ксеногенной опухоли*

[00294] BLI-визуализацию использовали для измерения опухолевой нагрузки. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через пять минут после этой инъекции проводили BLI-визуализацию мышей под анестезией с помощью изофлурана с применением системы Xenogen IVIS. Получение изображения проводили с полем обзора D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программным обеспечением Living Image. Сигналы BLI извлекали с использованием программного обеспечения Living Image: представляющие интерес области очерчивали вокруг каждой опухолевой массы, а интенсивность фотонов регистрировали как общий поток (фотоны в секунду – фотон/с).

Результаты.

[00295] Монотерапия с bsAb BCMAxCD3 обеспечивает умеренную противоопухолевую эффективность, при этом средние значения показателей BLI снижаются по сравнению с контролем. В то время как bsAb6031 CD38xCD28 не индуцирует какой-либо активности в качестве монотерапии, bsAb7945 проявляет активность в качестве монотерапии и незначительно снижает средние значения показателей BLI по сравнению с контролями. Однако комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс любое из bsAb CD38xCD28 приводит к средним значениям показателей BLI, которые ниже, чем при любой монотерапии. См. таблицы 19-29 и фигуру 5.

[00296] Таким образом, эти исследования демонстрируют, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAxCD3, либо с bsAb CD38xCD28 демонстрирует лишь умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 19. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 9

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 9	SEM суммарного потока в день 9	Количество мышей, остающихся в живых в день 9
Среда-носитель на основе PBS	5,74E+05	1,39E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,70E+05	2,94E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	6,74E+05	3,42E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	6,41E+05	6,46E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,55E+05	4,61E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) +	6,17E+05	2,23E+04	5 из 5

bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,97E+05	2,06E+04	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	5,14E+05	6,59E+03	4 из 4

Таблица 20. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 13

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 13	SEM суммарного потока в день 13	Количество мышей, остающихся в живых в день 13
Среда-носитель на основе PBS	1,33E+06	2,90E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,59E+06	3,30E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	9,76E+05	2,01E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	6,17E+05	4,39E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,42E+05	4,02E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,85E+05	5,45E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) +	5,55E+05	3,26E+04	5 из 5

bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
Без опухоли (фоновый BLI)	5,19E+05	4,67E+04	4 из 4

Таблица 21. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 16

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 16	SEM суммарного потока в день 16	Количество мышей, остающихся в живых в день 16
Среда-носитель на основе PBS	5,12E+06	1,68E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,05E+06	1,64E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	1,69E+06	5,68E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	8,81E+05	2,70E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,05E+05	4,20E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,78E+05	1,30E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,99E+05	5,42E+04	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	3,84E+05	2,37E+04	4 из 4

Таблица 22. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 20

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 20	SEM суммарного потока в день 20	Количество мышей, остающихся в живых в день 20
Среда-носитель на основе PBS	1,53E+07	3,29E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,46E+07	4,10E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	5,19E+06	2,21E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	1,17E+06	3,39E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,79E+05	1,27E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,10E+05	1,97E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,56E+05	4,70E+04	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	5,55E+05	2,93E+04	4 из 4

Таблица 23. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 24

Антитело	Опухолевая	SEM	Количество
-----------------	-------------------	------------	-------------------

Обработка	нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 24	суммарного потока в день 24	мышей, остающихся в живых в день 24
Среда-носитель на основе PBS	4,36E+07	5,76E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,27E+07	2,03E+07	4 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	1,90E+07	4,69E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	1,78E+06	7,82E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,54E+06	6,90E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,27E+05	1,83E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,45E+05	2,82E+04	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	3,52E+05	3,36E+04	4 из 4

Таблица 24. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 28

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний	SEM суммарного потока в	Количество мышей, остающихся
-------------------------------	--	--	---

	суммарный поток (фотон/с) в день 28	день 28	в живых в день 28
Среда-носитель на основе PBS	8,23E+07	1,52E+07	4 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,63E+06	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	6,45E+07	1,21E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	2,99E+06	1,49E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,99E+06	2,11E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,87E+05	9,24E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,06E+05	8,62E+04	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	4,17E+05	1,28E+04	4 из 4

Таблица 25. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 31

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток	SEM суммарного потока в день 31	Количество мышей, остающихся в живых в день 31
-----------------------	---	--	--

	(фотон/с) в день 31		
Среда-носитель на основе PBS	1,29E+08	4,60E+07	3 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,30E+07	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	6,94E+07	1,54E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	9,25E+06	5,75E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,59E+06	2,73E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	7,16E+05	1,49E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,85E+05	2,07E+05	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	4,19E+05	6,81E+04	4 из 4

Таблица 26. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 36

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 36	SEM суммарного потока в день 36	Количество мышей, остающихся в живых в день 36
-----------------------	---	--	--

Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	2,72E+08	2,22E+08	3 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	1,49E+07	1,01E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,76E+07	2,51E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,78E+05	2,06E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,25E+06	7,72E+05	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	4,45E+05	1,88E+04	4 из 4

Таблица 27. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 38

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 38	SEM суммарного потока в день 38	Количество мышей, остающихся в живых в день 38
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb			0 из 5

отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	4,56E+08	3,74E+08	3 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	1,29E+07	7,25E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,80E+07	3,35E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,27E+06	4,32E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,46E+06	2,11E+06	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	5,23E+05	2,30E+04	4 из 4

Таблица 28. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 45

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 45	SEM суммарного потока в день 45	Количество мышей, остающихся в живых в день 45
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 5

CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	5,75E+08	2,74E+08	2 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	7,04E+06	5,64E+06	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,75E+07	3,56E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,84E+06	2,62E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,10E+07	1,20E+07	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	5,11E+05	2,68E+04	4 из 4

Таблица 29. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 52

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 52	SEM суммарного потока в день 52	Количество мышей, остающихся в живых в день 52
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	4,47E+08	0,00E+00	1 из 5

CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	1,82E+07	1,73E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	2,24E+08	9,11E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,26E+07	7,44E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,60E+07	1,92E+07	5 из 5
Без опухоли (фоновый BLI)	4,40E+05	4,30E+04	4 из 4

Пример 10. Эффективность *in vivo* биспецифических антител к CD38 x CD28 в комбинации с 0,4 мг/кг или 0,04 мг/кг биспецифических антител к BCMA x CD3 в отношении роста опухоли множественной миеломы человека BCMA+CD38+ MOLP-8

[00297]Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 *in vivo* проводили исследование на ксеногенной опухоли клеток опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8. Этот эксперимент был аналогичен обсуждаемому выше в примере 9, за исключением того, что доза bsAb BCMAxCD3 была снижена с 4 мг/кг до 0,4 мг/кг или 0,04 мг/кг. Кроме того, продолжительность эксперимента в настоящем примере была короче, 40 дней, по сравнению с 52 днями в примере 9.

[00298]В день -12 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) (возраст 8-10 недель, Jackson Labs, № по кат. 005557) внутрибрюшинно вводили 4x10⁶ моноклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) от нормального здорового донора (Reach Bio, № по кат. 0500-301, лот №: 0180821). В день 0 мышам внутривенно вводили 2x10⁶ клеток опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8 (DSMZ, № по кат. ACC569), которые были сконструированы, чтобы также экспрессировать люцифразу светлячка (клетки

MOLP-8-люциферазы). Затем мышам (n=4-5 в группе) немедленно вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D в количестве 0,4 мг/кг), либо bsAb BCMAxCD3 (bsAb5458; в количестве 0,4 мг/кг или 0,04 мг/кг) в комбинации с CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля (bsAb5671) или bsAb CD38xCD28 (либо bsAb6031, либо bsAb7945) в количестве 4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в дни 7 и 14, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 40 дней путем измерения биолюминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=4) вводили только клетки MOLP-8-люциферазы и PBMC, но не антитела (группа, обработанная PBS). Для измерения фоновых уровней BLI группа мышей (n=5) не подвергалась обработке и не получала опухоли, PBMC или антитела (группа без опухоли).

[00299]*Измерение роста ксеногенной опухоли*

[00300]BLI-визуализацию использовали для измерения опухолевой нагрузки. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через пять минут после этой инъекции проводили BLI-визуализацию мышей под анестезией с помощью изофлурана с применением системы Xenogen IVIS. Получение изображения проводили с полем обзора D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программным обеспечением Living Image. Сигналы BLI извлекали с использованием программного обеспечения Living Image: представляющие интерес области очерчивали вокруг каждой опухолевой массы, а интенсивность фотонов регистрировали как общий поток (фотоны в секунду – фотон/с).

Результаты.

[00301]bsAb BCMAxCD3 (в количестве 0,4 мг/кг или 0,04 мг/кг) плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля обеспечивали умеренную и значительную противоопухолевую эффективность, при этом средние значения показателей BLI были снижены по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb

отрицательного контроля (ряды 3 и 10 в таблице 30 соответственно). Обработка с CD3-связывающим bsAb отрицательного контроля плюс любое из bsAb CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) умеренно и значительно снижала средние значения показателей BLI по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (ряды 1 и 2 в таблице 30 соответственно). Однако комбинация bsAb BCMAхCD3 (в количестве 0,4 мг/кг или 0,04 мг/кг) плюс любое из bsAb CD38хCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) приводила к получению средних значений показателей BLI, которые были значительно ниже, чем у мышей, получавших bsAb BCMAхCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (ряды 8, 9, 15 и 16 в таблице 30), мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb6031 (ряды 6 и 13 в таблице 30), или мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb7945 (ряды 7 и 14 в таблице 30). См. также таблицы 31-39 и фигуру 6.

[00302] Таким образом, эти исследования демонстрируют, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAхCD3, либо с bsAb CD38хCD28 демонстрирует лишь умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAхCD3 плюс bsAb CD38хCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 30. Статистические данные двухфакторного дисперсионного анализа в день 29:

	Сравнение	Значение Р (согласно двухфакторному дисперсионному анализу) в день 29
--	-----------	--

	Группа обработки 1	Группа обработки 2	
1	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	p=0,0214
2	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	P=0,0024
3	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	p=0,0147
4	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	p<0,0001
5	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	p<0,0001
6	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	p=0,0005

7	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p=0,0005
8	bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p=0,0001
9	bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p<0,0001
10	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	p=0,0043
11	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p<0,0001
12	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p<0,0001
13	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p=0,0083

	(4 мг/кг)		
14	CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p=0,0016
15	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	p=0,0128
16	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	bsAb BCMAхCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	P=0,0008

Таблица 31. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 6

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 6	SEM суммарного потока в день 6	Количество мышей, остающихся в живых в день 6
Среда-носитель на основе PBS	4,73E+05	3,23E+04	4 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,59E+05	2,29E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	5,07E+05	1,18E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb	4,41E+05	1,31E+04	5 из 5

отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,65E+05	3,84E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,02E+05	1,47E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,45E+05	2,80E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,13E+05	2,88E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,80E+05	2,67E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,79E+05	1,60E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	5,13E+05	2,54E+04	5 из 5

Таблица 32. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 9

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 9	SEM суммарного потока в день 9	Количество мышей, остающихся в живых в день 9
Среда-носитель на основе PBS	5,90E+05	5,72E+04	4 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb	6,06E+05	2,51E+04	5 из 5

отрицательного контроля (4 мг/кг)			
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	4,66E+05	4,43E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	3,49E+05	2,38E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,44E+05	1,96E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,56E+05	3,44E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,19E+05	7,67E+03	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,16E+05	4,20E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,68E+05	2,63E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,90E+05	3,34E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	3,73E+05	1,23E+04	5 из 5

Таблица 33. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 12

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в	SEM суммарного потока в день 12	Количество мышей, остающихся в живых в день 12
-----------------------	--	--	--

	день 12		
Среда-носитель на основе PBS	1,58E+06	2,88E+05	4 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,53E+06	1,97E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	6,06E+05	3,81E+04	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	4,23E+05	2,23E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,64E+05	3,49E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,76E+05	2,40E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,73E+05	1,85E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,66E+05	1,02E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,65E+05	1,92E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,46E+05	3,09E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,72E+05	1,80E+04	5 из 5

Таблица 34. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 16

Антитело	Опухолевая	SEM	Количество
----------	------------	-----	------------

Обработка	нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 16	суммарного потока в день 16	мышей, остающихся в живых в день 16
Среда-носитель на основе PBS	6,61E+06	2,28E+06	4 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	9,63E+06	1,55E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	1,66E+06	4,59E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	4,91E+05	5,60E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,25E+06	2,76E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,80E+05	2,95E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,89E+05	6,50E+03	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	2,95E+06	1,17E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,21E+05	4,07E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) +	5,54E+05	6,14E+04	4 из 4

bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
Без опухоли (фоновый BLI)	4,82E+05	3,37E+04	5 из 5

Таблица 35. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 21

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 21	SEM суммарного потока в день 21	Количество мышей, остающихся в живых в день 21
Среда-носитель на основе PBS	2,92E+07	1,81E+06	3 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,47E+07	7,52E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	9,33E+06	3,19E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	8,61E+05	3,23E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,97E+06	2,50E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,97E+05	3,55E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,90E+05	2,85E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) +	1,19E+07	4,65E+06	5 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,55E+05	1,12E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,80E+05	2,04E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,27E+05	1,17E+04	5 из 5

Таблица 36. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 26

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 26	SEM суммарного потока в день 26	Количество мышей, остающихся в живых в день 26
Среда-носитель на основе PBS	5,14E+07	2,24E+07	3 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,02E+07	1,36E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	3,41E+07	1,15E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	4,59E+06	1,82E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,61E+07	3,74E+06	5 из 5

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,57E+05	3,41E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	4,78E+05	3,86E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,37E+07	1,27E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,80E+06	1,54E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,59E+05	6,02E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,54E+05	2,72E+04	5 из 5

Таблица 37. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 29

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 29	SEM суммарного потока в день 29	Количество мышей, остающихся в живых в день 29
Среда-носитель на основе PBS	4,06E+07	7,54E+06	3 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,93E+07	3,61E+07	3 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	4,35E+07	1,48E+07	4 из 5
CD3-связывающее bsAb	3,89E+07	2,53E+07	5 из 5

отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,39E+07	7,99E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,73E+06	1,80E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,08E+05	1,78E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,05E+07	1,90E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,48E+06	5,22E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,18E+05	1,36E+05	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,99E+05	2,05E+04	5 из 5

Таблица 38. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 33

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 33	SEM суммарного потока в день 33	Количество мышей, остающихся в живых в день 33
Среда-носитель на основе PBS			0 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb			0 из 5

отрицательного контроля (4 мг/кг)			
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	3,76E+07	2,11E+07	2 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	2,11E+07	1,05E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,44E+07	1,22E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,04E+06	6,65E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,40E+06	6,40E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,15E+07	3,50E+07	2 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,58E+07	1,15E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,12E+06	4,20E+05	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,90E+05	3,80E+04	5 из 5

Таблица 39. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 36

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в	SEM суммарного потока в день 36	Количество мышей, остающихся в живых в день 36
-----------------------	--	--	--

	день 36		
Среда-носитель на основе PBS			0 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	6,01E+07	3,06E+07	2 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	4,21E+07	2,08E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,39E+08	4,35E+07	3 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,14E+07	7,71E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,75E+06	1,82E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	9,62E+07	5,28E+07	2 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,55E+07	4,38E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,90E+06	9,91E+05	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	5,89E+05	4,29E+04	5 из 5

Таблица 40. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 40

Антитело	Опухолевая	SEM	Количество
----------	------------	-----	------------

Обработка	нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 40	суммарного потока в день 0	мышей, остающихся в живых в день 40
Среда-носитель на основе PBS			0 из 4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 (4 мг/кг)	1,51E+08	9,84E+07	2 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 (4 мг/кг)	4,85E+07	1,59E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,03E+08	4,40E+07	2 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,64E+07	1,18E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,55E+06	2,42E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,75E+07	1,43E+07	2 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,61E+08	7,77E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,04 мг/кг) +	4,77E+06	2,16E+06	4 из 4

bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
Без опухоли (фоновый BLI)	5,88E+05	3,44E+04	5 из 5

Пример 11. Противоопухолевая эффективность *in vivo* биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с биспецифическими антителами к BCMAxCD3 в отношении опухолевых клеток BCMA⁺CD38⁺ WSU-DLCL2

[00303] Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 *in vivo* проводили исследование на ксеногенной опухоли. Этот эксперимент был аналогичен приведенным выше примерам 9 и 10, за исключением того, что линия опухолевых клеток, использованная в настоящем эксперименте, представляла собой клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, BCMA⁺CD38⁺ WSU-DLCL2, и единственным протестированным bsAb CD38/CD28 было bsAb6031.

[00304] В день 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) (возраст 8-10 недель, Jackson Labs, № по кат. 005557) подкожно вводили 3×10^6 опухолевых клеток WSU-DLCL2 (клеточная линия диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, DSMZ, № по кат. ACC575) и $0,5 \times 10^6$ PBMC от нормального донора (Reach Bio, № по кат. 0500-301, лот №: 0180821), смешанных вместе в 50% матрикеле. В день 1 мышам (n=5 в группе) вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D), либо bsAb BCMAxCD3 (bsAb5458) в комбинации с CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля (bsAb5671) или bsAb6031 CD38xCD28 в количестве 4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в дни 8 и 14, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали до дня 50 путем измерения объема опухоли.

[00305] Расчет роста и подавления ксеногенных опухолей

[00306] Для определения объема опухоли штангенциркулем определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объем опухоли на основании измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³) = (длина x ширина²)/2.

Результаты.

[00307]bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля обеспечивали умеренную противоопухолевую эффективность, при этом средние размеры опухоли уменьшались по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p=0,0004$ в день 40 и $p<0,0001$ в дни 43, 47 и 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Обработка с bsAb CD38xCD28 (bsAb6031) плюс CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля умеренно уменьшала средние размеры опухоли по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p=0,0007$ в день 40 и $p<0,0001$ в дни 43, 47 и 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Однако комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 (bsAb6031) приводила к получению средних размеров опухоли, которые были значительно меньше, чем у мышей, получавших bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p=0,0069$ в день 40 и $p<0,0001$ в дни 43, 47 и 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу), или мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb6031 CD38xCD28 ($p=0,0043$ в день 40 и $p<0,0001$ в дни 43, 47 и 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). См. таблицы 41-54 и фигуру 7.

[00308]Таким образом, эти исследования демонстрируют, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAxCD3, либо с bsAb CD38xCD28 демонстрирует умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 41. Опухолевая нагрузка в день 5

Антитело Обработка	Средний размер опухоли	SEM размера опухоли в
-----------------------	------------------------------	-----------------------------

	(мм ³) в день 5	день 5
Среда-носитель на основе PBS	58,6	10,6
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	50,8	2,7
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	59,2	5,4
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	53,2	7,5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	51,8	8,1

Таблица 42. Опухолевая нагрузка в день 8

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 8	SEM размера опухоли в день 8
Среда-носитель на основе PBS	68,6	7,8
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	36,8	7,7
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	44,6	9,5

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	29,6	2,1
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	31,8	10,2

Таблица 43. Опухолевая нагрузка в день 11

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 11	SEM размера опухоли в день 11
Среда-носитель на основе PBS	75,0	10,6
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	51,4	7,9
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	28,8	4,9
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	35,0	5,4
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	52,8	19,7

Таблица 44. Опухолевая нагрузка в день 14

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день	SEM размера опухоли в день 14
-------------------------------	---	--

	14	
Среда-носитель на основе PBS	101,6	14,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	62,4	9,5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	48,0	11,5
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	37,6	6,6
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	45,8	17,1

Таблица 45. Опухолевая нагрузка в день 18

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 18	SEM размера опухоли в день 18
Среда-носитель на основе PBS	124,6	14,7
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	81,2	10,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	62,6	11,8
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) +	47,0	5,7

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	40,4	13,4

Таблица 46. Опухолевая нагрузка в день 21

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 21	SEM размера опухоли в день 21
Среда-носитель на основе PBS	118,6	18,4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	110,8	15,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	80,4	14,7
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	76,6	17,0
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	45,0	18,6

Таблица 47. Опухолевая нагрузка в день 25

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 25	SEM размера опухоли в день 25
-------------------------------	--	--

Среда-носитель на основе PBS	188,4	25,5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	144,2	11,9
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	103,6	22,9
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	75,0	15,9
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	36,6	14,9

Таблица 48. Опухолевая нагрузка в день 27

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 27	SEM размера опухоли в день 27
Среда-носитель на основе PBS	199,0	29,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	165,6	18,7
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	115,8	24,6
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb	88,2	19,7

отрицательного контроля (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	40,0	16,8

Таблица 49. Опухолевая нагрузка в день 33

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 33	SEM размера опухоли в день 33
Среда-носитель на основе PBS	340,2	42,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	287,2	27,0
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	172,2	27,6
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	148,2	14,2
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	68,4	29,9

Таблица 50. Опухолевая нагрузка в день 36

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 36	SEM размера опухоли в день 36
Среда-носитель на основе PBS	366,8	40,6

CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	381,8	40,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	193,4	40,2
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	190,0	22,6
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	66,2	30,0

Таблица 51. Опухолевая нагрузка в день 40

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 40	SEM размера опухоли в день 40
Среда-носитель на основе PBS	591,2	117,6
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	530,0	39,4
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	294,8	58,4
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	286,0	48,8

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	89,6	40,8
---	------	------

Таблица 52. Опухолевая нагрузка в день 43

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 43	SEM размера опухоли в день 43
Среда-носитель на основе PBS	741,0	140,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	782,0	45,3
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	461,8	79,3
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	411,6	39,4
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	146,6	58,3

Таблица 53. Опухолевая нагрузка в день 47

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 47	SEM размера опухоли в день 47
Среда-носитель на основе PBS	717,8	113,5
CD3-связывающее bsAb	1043,0	113,3

отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)		
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	572,4	104,0
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	486,8	62,2
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	173,2	82,2

Таблица 54. Опухолевая нагрузка в день 50

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 50	SEM размера опухоли в день 50
Среда-носитель на основе PBS	922,8	188,6
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1155,4	105,6
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	705,8	110,2
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	615,2	86,4
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) +	197,8	92,0

bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)		
------------------------------	--	--

Пример 12. Противоопухолевая эффективность *in vivo* биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 в отношении роста опухолевых клеток множественной миеломы человека BCMA+CD38+ MOLP-8

[00309] Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 *in vivo* проводили исследование на ксеногенной опухоли. Как и в предыдущих экспериментах в примерах 9 и 10, в этом эксперименте изменили дозу bsAb BCMAxCD3 с 4 мг/кг до 0,4 мг/кг, а дозу bsAb6031 и bsAb7945 до 0,4 мг/кг. Кроме того, продолжительность эксперимента в настоящем примере была короче, 44 дня, по сравнению с 52 днями в примере 9.

[00310] Имплантация и измерение ксеногенных опухолей

[00311] В день -12 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) (возраст 8-10 недель, Jackson Labs, № по кат. 005557) внутрибрюшинно вводили 4×10^6 мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) от нормального здорового донора (Reach Bio, № по кат. 0500-301, лот №: 0180821). В день 0 мышам внутривенно вводили 2×10^6 клеток опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8 (DSMZ, № по кат. ACC569), которые были сконструированы, чтобы также экспрессировать люциферазу светлячка (клетки MOLP-8-люциферазы). Затем мышам (n=5 в группе) немедленно вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D), либо bsAb BCMAxCD3 (bsAb5458) в количестве 0,4 мг/кг, в комбинации с CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля (bsAb5671) в количестве 4 мг/кг или bsAb CD38xCD28 (либо bsAb6031, либо bsAb7945) в количестве 0,4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в дни 7 и 15, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 44 дней путем измерения биолюминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) вводили только клетки MOLP-8-люциферазы и PBMC, но не антитела (группа, обработанная PBS). Для

измерения фоновых уровней BLI группа мышей (n=5) не подвергалась обработке и не получала опухоли, РВМС или антитела (группа без опухоли).

[00312]*Измерение роста ксеногенной опухоли*

[00313]BLI-визуализацию использовали для измерения опухолевой нагрузки. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через пять минут после этой инъекции проводили BLI-визуализацию мышей под анестезией с помощью изофлурана с применением системы Xenogen IVIS. Получение изображения проводили с полем обзора D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программным обеспечением Living Image. Сигналы BLI извлекали с использованием программного обеспечения Living Image: представляющие интерес области очерчивали вокруг каждой опухолевой массы, а интенсивность фотонов регистрировали как общий поток (фотоны в секунду – фотон/с).

Результаты.

[00314]bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля обеспечивали умеренную противоопухолевую эффективность, при этом средние значения показателей BLI были снижены по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля. Обработка с помощью CD3-связывающего bsAb отрицательного контроля плюс любое из bsAb CD38xCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) умеренно снижала средние значения показателей BLI по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля. Однако комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс любое из bsAb CD38xCD28 (bsAb6031 и bsAb7945) приводила к получению средних значений показателей BLI, которые были значительно ниже, чем у мышей, получавших bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля, мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb6031, или мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb7945. См.

таблицы 55-64 и фигуру 8.

[00315] Таким образом, эти исследования демонстрируют, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAxCD3, либо с bsAb CD38xCD28 демонстрирует лишь умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 55. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 9

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 9	SEM суммарного потока в день 9	Количество мышей, остающихся в живых в день 9
Среда-носитель на основе PBS	1,66E+06	1,22E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,98E+06	3,53E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,04E+06	5,74E+05	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,65E+05	1,49E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	5,06E+05	1,21E+05	5 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,52E+05	2,71E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	3,57E+05	2,01E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,26E+05	2,05E+04	5 из 5

Таблица 56. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 14

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 14	SEM суммарного потока в день 14	Количество мышей, остающихся в живых в день 14
Среда-носитель на основе PBS	2,98E+07	8,54E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,29E+07	9,51E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,74E+07	4,37E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	9,05E+06	2,97E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	2,48E+06	1,93E+06	5 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	5,28E+05	4,62E+04	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,72E+05	4,23E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,15E+05	4,91E+03	5 из 5

Таблица 57. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 17

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 17	SEM суммарного потока в день 17	Количество мышей, остающихся в живых в день 17
Среда-носитель на основе PBS	4,64E+07	1,11E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,90E+07	9,00E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,81E+07	4,48E+06	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,25E+07	6,35E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	9,49E+06	8,38E+06	5 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,14E+05	1,16E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	5,40E+05	4,87E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,78E+05	1,75E+04	5 из 5

Таблица 58. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 21

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 21	SEM суммарного потока в день 21	Количество мышей, остающихся в живых в день 21
Среда-носитель на основе PBS	7,45E+07	3,12E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,45E+07	2,70E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	5,99E+07	1,05E+07	5 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,62E+07	9,18E+06	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	1,57E+07	1,22E+07	5 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	9,49E+05	3,50E+05	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,49E+05	1,14E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,30E+05	1,56E+04	5 из 5

Таблица 59. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 24

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 24	SEM суммарного потока в день 24	Количество мышей, остающихся в живых в день 24
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,38E+06	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,02E+07	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,19E+07	2,01E+07	2 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	1,02E+07	5,05E+06	4 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,49E+06	1,59E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	6,60E+05	9,94E+04	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	5,72E+05	3,29E+04	5 из 5

Таблица 60. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 28

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 28	SEM суммарного потока в день 28	Количество мышей, остающихся в живых в день 28
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,13E+07	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	3,94E+07	0,00E+00	1 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	4,01E+07	2,14E+07	4 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,74E+06	5,60E+06	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	6,73E+05	1,97E+05	4 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	3,46E+05	1,10E+04	5 из 5

Таблица 61. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 31

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 31	SEM суммарного потока в день 31	Количество мышей, остающихся в живых в день 31
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,59E+07	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,43E+07	0,00E+00	1 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	5,53E+07	3,02E+07	4 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	3,52E+07	2,13E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,01E+06	4,56E+05	3 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,53E+05	2,11E+04	5 из 5

Таблица 62. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 34

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 34	SEM суммарного потока в день 34	Количество мышей, остающихся в живых в день 34
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,79E+07	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,37E+08	0,00E+00	1 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	2,80E+08	1,40E+08	3 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,41E+07	2,79E+07	5 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,68E+06	1,10E+06	3 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	5,90E+05	3,29E+04	5 из 5

Таблица 63. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 38

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 38	SEM суммарного потока в день 38	Количество мышей, остающихся в живых в день 38
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	2,64E+08	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	7,07E+08	4,05E+08	3 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,12E+07	6,96E+07	4 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,37E+06	3,87E+06	3 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	4,86E+05	1,15E+04	5 из 5

Таблица 64. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 44

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 44	SEM суммарного потока в день 44	Количество мышей, остающихся в живых в день 44
Среда-носитель на основе PBS			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,27E+09	0,00E+00	1 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			0 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	2,33E+08	1,33E+08	3 из 5

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,49E+08	2,39E+08	3 из 5
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,88E+07	1,79E+07	2 из 4
Без опухоли (фоновый BLI)	6,22E+05	7,86E+04	5 из 5

Пример 13. Анализ перекрестной конкуренции на основе CD38

[00316] Анализ конкурентного связывания проводили для оценки способности биспецифических антител к CD38xCD28, исходных антител к CD38 и антител сравнения к CD38 конкурировать друг с другом за связывание с hCD38.mmh.

[00317] Весь эксперимент проводили при температуре 25°C со скоростью потока 1000 об/мин в буфере Octet HBS-EP (pH 7,4 плюс 1 мг/мл BSA). Чтобы оценить, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами на рекомбинантном CD38 человека, экспрессированном с С-концевой меткой тус-тус-гексагистидин (hCD38-mmH), около 0,27 нМ hCD38.mmH осуществляли захват путем погружения наконечников Octet, с высокой плотностью покрытых антителом к His1K, в лунки, содержащие 50 мкг/мл (300 нМ) hCD38.mmh, на 5 мин. Затем покрытые антигеном наконечники сенсора помещали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора первого моноклонального антитела к CD38 или биспецифического антитела, на 5 минут для насыщения поверхности hCD38.mmH. Затем наконечники сенсора погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела к CD38 или биспецифического антитела. Наконечники сенсора промывали в буфере Octet HBS-EP между всеми стадиями эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени отслеживали в ходе эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Сравнивали ответ связывания антитела с предварительно полученным комплексом hCD38.mmH с первым антителом и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных и биспецифических антител к CD38.

[00318]Результаты. Не показанные данные указывают на то, что антитела к CD38хCD28 bsAb7945 и bsAb6031 двунаправленно конкурируют друг с другом за связывание с hCD38.mmh. Исходные антитела к CD38 также продемонстрировали двунаправленную перекрестную конкуренцию за связывание с hCD38.mmh.

Пример 14. Противоопухолевая эффективность *in vivo* биспецифических антител (bsAb) к CD38хCD28 в комбинации с bsAb BCMAхCD3 в отношении роста опухолевых клеток BCMA⁺CD38⁺ WSU-DLCL2

[00319]Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38хCD28 в комбинации с bsAb BCMAхCD3 *in vivo*, проводили следующее исследование на ксеногенной опухоли. Этот пример аналогичен предыдущему эксперименту в примере 11, однако в этом эксперименте также исследовали дозы bsAb6031 и bsAb7945 0,4 мг/кг и 0,04 мг/кг.

[00320]*Имплантация и измерение ксеногенных опухолей.*

[00321]В день 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно вводили 3х10⁶ опухолевых клеток BCMA⁺CD38⁺ WSU-DLCL2 и 0,5х10⁶ PBMC от нормального донора, смешанных вместе в 50% матригеле. В день 1 мышам (n=5 в группе) вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D), либо bsAb BCMAхCD3 (bsAb5458) в количестве 0,4 мг/кг в комбинации с CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля (bsAb5671) в количестве 4 мг/кг или bsAb CD38хCD28 (либо bsAb6031, либо bsAb7945) в количестве 4 мг/кг, или 0,4 мг/кг, или 0,04 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в дни 8 и 15, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали до дня 50 путем измерения объема опухоли.

[00322]*Расчет роста и подавления ксеногенных опухолей*

[00323]Для определения объема опухоли штангенциркулем определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объем опухоли на основании измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³) = (длина х ширина²)/2.

Результаты.

[00324]bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля обеспечивали умеренную противоопухолевую эффективность, при этом средние размеры опухоли уменьшались по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Обработка с bsAb6031 CD38xCD28 плюс CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля умеренно уменьшала средние размеры опухоли по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p = 0,0089$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Обработка с bsAb7945 CD38xCD28 плюс CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля умеренно уменьшала средние размеры опухоли по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Однако комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb6031 CD38xCD28 в количестве 4 мг/кг приводила к получению средних размеров опухоли, которые были значительно меньше, чем у мышей, получавших bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу), или мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb6031 CD38xCD28 ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Кроме того, комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb7945 CD38xCD28 в количестве 4 мг/кг и 0,4 мг/кг приводила к получению средних размеров опухоли, которые были значительно меньше, чем у мышей, получавших bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу для обеих доз), или мышей, получавших CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс bsAb6031 CD38xCD28 ($p < 0,0001$ в день 50 согласно двухфакторному дисперсионному анализу для обеих доз). См. фигуру 9 и таблицы 65-78.

[00325] Эти исследования подтверждают, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAxCD3, либо с bsAb CD38xCD28 демонстрирует умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 65. Опухолевая нагрузка в день 4

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 4	SEM размера опухоли в день 4
Среда-носитель на основе PBS	85,50	16,18
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	66,10	5,19
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	56,82	4,05
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	66,45	6,01
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	74,71	3,16
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	51,39	5,57
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	50,11	6,03

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	83,73	9,58
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	64,12	6,04
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	54,57	3,77
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	63,14	3,11

Таблица 66. Опухолевая нагрузка в день 8

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 8	SEM размера опухоли в день 8
Среда-носитель на основе PBS	55,83	2,38
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	71,47	6,67
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	51,44	3,02
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	56,85	5,01
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	53,51	6,15
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	42,03	4,38

bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	57,05	5,82
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	73,74	4,07
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	50,21	5,48
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	53,78	3,73
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	56,03	3,47

Таблица 67. Опухолевая нагрузка в день 12

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 12	SEM размера опухоли в день 12
Среда-носитель на основе PBS	85,78	12,07
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	83,84	8,78
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	80,34	4,68
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	85,66	8,35
CD3-связывающее bsAb	82,00	3,62

отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	63,97	7,77
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	99,11	12,46
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	97,39	3,49
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	71,13	6,31
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	74,53	8,22
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	96,15	6,91

Таблица 68. Опухолевая нагрузка в день 15

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 15	SEM размера опухоли в день 15
Среда-носитель на основе PBS	96,13	6,95
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	108,55	9,12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	77,60	4,77
CD3-связывающее bsAb	95,61	4,30

отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)		
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	107,35	3,75
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	77,48	7,64
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (0,4 мг/кг)	111,19	5,43
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (0,04 мг/кг)	131,37	6,27
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	85,93	11,39
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,4 мг/кг)	90,88	9,25
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,04 мг/кг)	122,56	8,22

Таблица 69. Опухолевая нагрузка в день 18

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 18	SEM размера опухоли в день 18
Среда-носитель на основе PBS	106,35	12,16
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	120,82	10,41
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) +	104,88	9,04

CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)		
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	116,50	4,33
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	121,23	6,49
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (4 мг/кг)	79,21	6,63
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (0,4 мг/кг)	118,88	13,24
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38хCD28 (0,04 мг/кг)	148,63	12,24
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	70,63	6,89
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,4 мг/кг)	83,16	6,72
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,04 мг/кг)	143,53	22,02

Таблица 70. Опухолевая нагрузка в день 22

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 22	SEM размера опухоли в день 22
Среда-носитель на основе PBS	146,39	17,98
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг)	192,17	15,35

+ CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	130,06	14,28
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	160,92	12,52
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	168,61	10,10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	108,90	12,96
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	148,48	16,02
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	189,83	14,62
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	74,83	2,85
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	71,89	8,02
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	140,61	20,63

Таблица 71. Опухолевая нагрузка в день 26

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 26	SEM размера опухоли в день 26
-----------------------	---	--

Среда-носитель на основе PBS	204,12	26,45
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	267,72	31,94
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	190,92	13,67
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	244,00	27,60
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	218,67	5,28
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	144,50	13,44
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	266,65	24,05
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	323,35	28,97
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	79,75	4,75
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	81,49	17,70
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	209,38	42,42

Таблица 72. Опухолевая нагрузка в день 29

Антитело Обработка	Средний размер	SEM размера
-----------------------	-------------------	----------------

	опухоли (мм ³) в день 29	опухоли в день 29
Среда-носитель на основе PBS	240,89	20,67
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	340,58	33,04
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	226,09	16,33
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	300,95	45,46
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	220,35	8,48
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	146,60	15,78
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	358,00	34,85
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	408,27	29,03
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	91,00	6,00
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	87,99	15,00
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	237,40	53,41

Таблица 73. Опухолевая нагрузка в день 33

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 33	SEM размера опухоли в день 33
Среда-носитель на основе PBS	322,30	26,49
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	476,53	27,19
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	340,84	40,81
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	406,59	51,88
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	351,79	16,97
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	208,14	28,76
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	464,58	54,13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	590,23	56,94
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	123,92	21,27
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	103,05	12,96
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	318,65	74,12

bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)		
---------------------------------	--	--

Таблица 74. Опухолевая нагрузка в день 36

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 36	SEM размера опухоли в день 36
Среда-носитель на основе PBS	409,05	30,64
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	619,65	42,22
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	383,08	61,14
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	446,97	48,15
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	445,04	29,21
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	280,56	34,13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	557,24	78,00
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	648,82	81,16
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	127,30	24,04

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	111,12	14,87
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	400,33	103,59

Таблица 75. Опухолевая нагрузка в день 39

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 39	SEM размера опухоли в день 39
Среда-носитель на основе PBS	502,34	28,84
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	799,34	58,49
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	499,98	49,70
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	605,29	69,33
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	579,16	38,09
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	297,89	36,15
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	719,36	47,93
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	925,08	99,40

bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	159,10	35,59
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	126,81	16,92
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	468,32	127,47

Таблица 76. Опухолевая нагрузка в день 43

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 43	SEM размера опухоли в день 43
Среда-носитель на основе PBS	704,71	71,69
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1138,42	65,21
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	731,60	53,59
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	867,05	101,16
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	684,22	17,96
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	427,12	57,21

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	956,84	102,11
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1197,95	138,72
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	204,36	51,71
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	176,31	27,26
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	666,85	192,44

Таблица 77. Опухолевая нагрузка в день 48

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм³) в день 48	SEM размера опухоли в день 48
Среда-носитель на основе PBS	769,26	65,08
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1640,91	122,90
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1008,89	43,06
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1278,26	154,03
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг)	958,84	72,53

+ bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)		
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	606,92	75,49
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1506,77	251,49
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1737,78	234,10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	264,67	74,97
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	198,78	30,83
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	899,61	263,60

Таблица 78. Опухолевая нагрузка в день 50

Антитело Обработка	Средний размер опухоли (мм ³) в день 50	SEM размера опухоли в день 50
Среда-носитель на основе PBS	934,63	48,33
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1829,70	151,42
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1245,51	46,95
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг)	1445,19	155,75

+ bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)		
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1023,52	81,70
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)	730,89	179,00
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1591,50	286,71
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1855,56	272,36
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	260,42	60,39
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	262,05	30,60
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1038,47	330,97

Пример 15. Противоопухолевая эффективность *in vivo* биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 в отношении роста опухолевых клеток множественной миеломы человека BCMA+CD38+ MOLP-8

[00326] Для определения противоопухолевой эффективности биспецифических антител (bsAb) к CD38xCD28 в комбинации с bsAb BCMAxCD3 *in vivo* проводили исследование на ксеногенной опухоли. Этот пример аналогичен эксперименту в примере 12, однако в этом эксперименте было протестировано больше мышей (10-13 на группу по сравнению с 5 мышами на группу в примере 12) и продолжительность настоящего исследования была больше (48 дней по сравнению с 44 днями в примере 12).

[00327] Имплантация и измерение ксеногенных опухолей

[00328] В день -12 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) внутрибрюшинно вводили 4×10^6 моноклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) от нормального здорового донора. В день 0 мышам внутривенно вводили 2×10^6 клеток опухоли множественной миеломы человека BCMA⁺CD38⁺ MOLP-8, которые были сконструированы, чтобы также экспрессировать люциферазу светлячка (клетки MOLP-8-люциферазы). Затем мышам (n=10-13 в группе) немедленно вводили либо CD3-связывающее биспецифическое Ab отрицательного контроля (H4sH17664D), либо bsAb BCMAxCD3 (bsAb5458) в количестве 0,4 мг/кг, в комбинации с CD28-связывающим биспецифическим Ab отрицательного контроля (bsAb5671) или bsAb CD38xCD28 (либо bsAb6031, либо bsAb7945) в количестве 0,4 мг/кг. Мышам вводили эти Ab еще дважды в дни 7 и 14, в общей сложности три дозы. Рост опухоли оценивали в течение 48 дней путем измерения биолуминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) вводили только клетки MOLP-8-люциферазы и PBMC, но не антитела (группа, обработанная PBS). Для измерения фоновых уровней BLI группа мышей (n=5) не подвергалась обработке и не получала опухоли, PBMC или антитела (группа без опухоли).

[00329] *Измерение роста ксеногенной опухоли*

[00330] BLI-визуализацию использовали для измерения опухолевой нагрузки. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через пять минут после этой инъекции проводили BLI-визуализацию мышей под анестезией с помощью изофлурана с применением системы Xenogen IVIS. Получение изображения проводили с полем обзора D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программным обеспечением Living Image. Сигналы BLI извлекали с использованием программного обеспечения Living Image: представляющие интерес области очерчивали вокруг каждой опухолевой массы, а интенсивность фотонов регистрировали как общий поток (фотоны в секунду – фотон/с).

Результаты.

[00331]bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля обеспечивали некоторую противоопухолевую эффективность, при этом средние значения показателей BLI были снижены по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в дни 20, 23 и 27 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Обработка с CD3-связывающим bsAb отрицательного контроля плюс bsAb CD38xCD28 (bsAb7945) умеренно уменьшала средние значения показателей BLI по сравнению с мышами, получавшими CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля ($p < 0,0001$ в день 23 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). Однако комбинация bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 (bsAb7945) во всех трех дозах приводила к получению средних значений показателей BLI, которые были ниже, чем у мышей, получавших bsAb BCMAxCD3 плюс CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (день 44 двухфакторный дисперсионный анализ: $p < 0,0001$ для дозы 4 мг/кг bsAb7945, $p = 0,0007$ для дозы 0,4 мг/кг bsAb7945 и $p = 0,0018$ для дозы 0,04 мг/кг bsAb7945; $p < 0,0001$ для всех 3 доз bsAb7945 в день 48 согласно двухфакторному дисперсионному анализу). См. фигуру 10 и таблицы 79-90 ниже.

[00332]Таким образом, эти исследования демонстрируют, что в то время как монотерапия либо с bsAb BCMAxCD3, либо с bsAb CD38xCD28 демонстрирует лишь умеренную противоопухолевую эффективность, комбинированная обработка с bsAb BCMAxCD3 плюс bsAb CD38xCD28 приводит к более мощной комбинированной противоопухолевой эффективности, которая превосходит любую однокомпонентную терапию.

Таблица 79. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 9

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный	SEM суммарного потока в день 9	Количество мышей, остающихся в живых в
-----------------------	--	---	---

	поток (фотон/с) в день 9		день 9
Среда-носитель на основе PBS	7,13E+05	2,30E+04	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,03E+05	2,63E+04	10 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	7,51E+05	2,55E+04	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	7,15E+05	1,75E+04	10 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	7,09E+05	2,28E+04	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,55E+05	2,39E+04	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	7,57E+05	3,17E+04	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	7,69E+05	3,56E+04	5 из 5

Таблица 80. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 13

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в	SEM суммарного потока в день 13	Количество мышей, остающихся в живых в день 13
-------------------------------	--	--	---

	день 13		
Среда-носитель на основе PBS	1,41E+06	2,00E+05	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,25E+06	1,32E+05	10 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,27E+05	2,25E+04	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,83E+05	2,62E+04	10 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	7,43E+05	1,83E+04	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	7,68E+05	2,12E+04	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	7,65E+05	2,98E+04	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	7,68E+05	4,85E+04	5 из 5

Таблица 81. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 16

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 16	SEM суммарного потока в день 16	Количество мышей, остающихся в живых в день 16
Среда-носитель на основе PBS	6,55E+06	1,63E+06	10 из 10

CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	4,28E+06	8,89E+05	10 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,44E+05	2,50E+04	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,79E+06	1,79E+05	9 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,98E+05	4,57E+04	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	8,96E+05	2,07E+04	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	8,11E+05	2,86E+04	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,64E+05	4,19E+04	5 из 5

Таблица 82. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 20

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 20	SEM суммарного потока в день 20	Количество мышей, остающихся в живых в день 20
Среда-носитель на основе PBS	1,70E+07	3,68E+06	9 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4	1,32E+07	2,66E+06	10 из 10

мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	8,16E+05	5,11E+04	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	5,41E+06	9,13E+05	9 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,05E+05	3,30E+04	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	9,25E+05	3,90E+04	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	8,83E+05	3,98E+04	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,26E+05	4,69E+04	5 из 5

Таблица 83. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 23

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 23	SEM суммарного потока в день 23	Количество мышей, остающихся в живых в день 23
Среда-носитель на основе PBS	2,87E+07	4,94E+06	8 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	2,54E+07	5,18E+06	10 из 10

bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	9,78E+05	1,26E+05	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	9,16E+06	1,39E+06	9 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	8,65E+05	4,55E+04	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	9,32E+05	2,37E+04	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	8,71E+05	4,66E+04	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,29E+05	2,83E+04	5 из 5

Таблица 84. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 27

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 27	SEM суммарного потока в день 27	Количество мышей, остающихся в живых в день 27
Среда-носитель на основе PBS	3,68E+07	4,83E+06	6 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,66E+07	5,05E+06	4 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb	1,66E+06	4,36E+05	10 из 10

отрицательного контроля (4 мг/кг)			
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	1,55E+07	3,85E+06	8 из 10
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (4 мг/кг)	9,86E+05	7,69E+04	13 из 13
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,4 мг/кг)	1,03E+06	4,51E+04	12 из 12
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38хCD28 (0,04 мг/кг)	1,02E+06	1,07E+05	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,44E+05	2,71E+04	5 из 5

Таблица 85. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 30

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 30	SEM суммарного потока в день 30	Количество мышей, остающихся в живых в день 30
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	5,50E+07	0,00E+00	1 из 10
bsAb BCMAхCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,38E+06	1,63E+06	10 из 10
CD3-связывающее bsAb	5,46E+07	2,30E+07	5 из 10

отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,17E+06	1,45E+05	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,18E+06	1,34E+05	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1,23E+06	2,79E+05	10 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,94E+05	2,91E+04	5 из 5

Таблица 86. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 34

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 34	SEM суммарного потока в день 34	Количество мышей, остающихся в живых в день 34
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,14E+06	2,55E+06	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	6,54E+07	2,84E+07	2 из 10

мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	1,27E+06	2,15E+05	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	2,50E+06	1,24E+06	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	1,91E+06	8,17E+05	9 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	7,45E+05	1,33E+04	5 из 5

Таблица 87. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 37

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 37	SEM суммарного потока в день 37	Количество мышей, остающихся в живых в день 37
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	1,02E+07	4,44E+06	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	1,96E+06	5,75E+05	13 из 13

bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	4,04E+06	2,34E+06	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	3,20E+06	1,53E+06	8 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	9,82E+05	3,75E+04	5 из 5

Таблица 88. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 41

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 41	SEM суммарного потока в день 41	Количество мышей, остающихся в живых в день 41
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	3,17E+07	1,18E+07	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,57E+06	1,03E+06	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	4,74E+06	1,93E+06	12 из 12

bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)			
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	5,72E+06	3,76E+06	8 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,72E+05	4,59E+04	5 из 5

Таблица 89. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 44

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 44	SEM суммарного потока в день 44	Количество мышей, остающихся в живых в день 44
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	6,82E+07	2,25E+07	10 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	2,45E+06	9,91E+05	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,57E+07	1,12E+07	12 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) +	1,37E+07	9,85E+06	8 из 10

bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)			
Без опухоли (фоновый BLI)	6,41E+05	2,20E+04	5 из 5

Таблица 90. Опухолевая нагрузка и выжившие мыши в день 48

Антитело Обработка	Опухолевая нагрузка – Средний суммарный поток (фотон/с) в день 48	SEM суммарного потока в день 48	Количество мышей, остающихся в живых в день 48
Среда-носитель на основе PBS			0 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее bsAb отрицательного контроля (4 мг/кг)	2,08E+08	7,43E+07	9 из 10
CD3-связывающее bsAb отрицательного контроля (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)			0 из 10
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)	3,26E+06	1,33E+06	13 из 13
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)	1,34E+07	5,57E+06	11 из 12
bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)	2,26E+07	1,29E+07	8 из 10
Без опухоли (фоновый BLI)	8,63E+05	4,83E+04	5 из 5

[00333]Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая

(a) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD38 человека на опухолевой клетке-мишени; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD28 человека с KD, составляющей менее чем приблизительно 26 нМ.

2. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где первый антигенсвязывающий домен связывается с CD38 с константой диссоциации (K_D), составляющей менее чем приблизительно 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

3. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где второй антигенсвязывающий домен связывается с CD28 с константой диссоциации (K_D), составляющей менее чем приблизительно 26 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

4. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где биспецифическое антитело обладает одной или более из следующих характеристик:

(a) активирует первичные Т-клетки человека, что определяется по увеличению высвобождения IL2, высвобождения IFN γ и пролиферации Т-клеток;

(b) усиливает цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, опосредованную биспецифическим антителом к ВСМАхCD3;

(c) усиливает лизис клеток-мишеней, ассоциированный с активацией Т-клеток, измеренной по увеличению экспрессии CD25 на CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клетках, опосредованный биспецифическим антителом к ВСМАхCD3;

(d) усиливает лизис клеток-мишеней, ассоциированный с пролиферацией Т-клеток, измеренной по разбавлению красителя в CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клетках, опосредованный биспецифическим антителом к ВСМАхCD3;

(e) усиливает высвобождение цитокинов, опосредованное биспецифическим антителом к BCMA $\times$ CD3;

(f) демонстрирует снижение опухолевой нагрузки, опосредованное биспецифическим антителом к BCMA $\times$ CD3, на мышинной модели множественной миеломы или

(g) демонстрирует повышенную выживаемость, опосредованную биспецифическим антителом к BCMA $\times$ CD3, на мышинной модели множественной миеломы.

5. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—4, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула повышает высвобождение IL2 в CD38 $^{+}$ клетках с EC50, составляющей менее чем приблизительно 1 нМ.

6. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—4, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула повышает высвобождение IFN γ в CD38 $^{+}$ клетках с EC50, составляющей менее чем приблизительно 750 пМ.

7. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—4, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула повышает пролиферацию CD38 $^{+}$ клеток с EC50, составляющей менее чем приблизительно 150 пМ.

8. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—7, где опухолевая клетка-мишень представляет собой плазматическую клетку.

9. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—8, где опухолевая клетка-мишень получена от пациента, страдающего множественной миеломой, В-клеточным лейкозом, гепатоцеллюлярной карциномой, немелкоклеточным раком легкого, меланомой, аденокарциномой протоков поджелудочной железы, глиомой, или раком молочной железы, или другим видом рака, частично характеризующимся наличием CD38 $^{+}$ клеток.

10. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—8, где опухолевая клетка-мишень получена от пациента, страдающего множественной миеломой или другим В-клеточным нарушением, которое частично характеризуется наличием В-клеток, экспрессирующих ВСМА.

11. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—10, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула подавляет пролиферацию экспрессирующих CD38 опухолевых клеток в дозе, составляющей от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 4,0 мг/кг.

12. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—11, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула подавляет пролиферацию CD38⁺ клеток опухоли, выбранных из группы, состоящей из клеток миеломы, клеток лейкоза, клеток гепатоцеллюлярной карциномы, клеток немелкоклеточного рака легкого, клеток меланомы, клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы, клеток глиомы или клеток рака молочной железы.

13. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—9, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула подавляет пролиферацию CD38⁺ клеток опухоли, выбранных из группы, состоящей из клеток H929, клеток MOLP-8 и клеток опухоли WSU-DLCL2.

14. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—13, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; и

(b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

15. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 14, которая содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

16. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 14 или п. 15, которая содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

17. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 14, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

18. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—13, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и

(b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

19. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 18, которая содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.

20. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 18 или п. 19, которая содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, LCDR2, содержащую аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 52, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54.

21. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 18, где первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

22. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—21, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

(a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; и

(b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

23. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 22, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

24. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 22 или п. 23, где второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

25. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 22, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

26. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—21, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

(a) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40; и

(b) три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

27. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 26, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46.

28. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 26 или п. 27, где второй антигенсвязывающий домен содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54.

29. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 22, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48.

30. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 16.

31. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 30, содержащая аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 24.

32. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 30, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

33. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 30 или п. 32, содержащая аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 18.

34. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 38; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 44 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 46.

35. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 34, содержащая аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 50,

аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 52 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 54.

36. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 34, содержащая:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и

(b) второй антигенсвязывающий домен, который содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

37. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 34 или п. 36, содержащая аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 48.

38. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с CD38 или связывается с тем же эпитопом на CD38, что и эталонное антитело по любому из пп. 30—37.

39. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует за связывание с CD28 человека или связывается с тем же эпитопом на CD28 человека, что и эталонное антитело по любому из пп. 30—37.

40. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1—39, которая представляет собой биспецифическое антитело человека.

41. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 40, где биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека.

42. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 41, где константная область тяжелой цепи IgG человека относится к изотипу IgG1.

43. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 41, где константная область тяжелой цепи IgG человека относится к изотипу IgG4.

44. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 40—43, где биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который

снижает связывание Fcγ-рецептора по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

45. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD38 человека, где антитело содержит последовательности, выбранные из группы, состоящей из следующего:

(i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR), характеризующейся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или 32; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR), характеризующейся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18 или 48;

(ii) три HCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, и три LCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 18;

(iii) три HCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 32, и три LCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 48;

(iv) комбинация аминокислотных последовательностей HCDR/LCDR под SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24;

(v) комбинация аминокислотных последовательностей HCDR/LCDR под SEQ ID NO: 34-36-38-50-52-54;

(vi) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 2 или 32; и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 18 или 48;

(vii) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 18; и

(viii) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 32, и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 48.

46. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD28 человека, где антитело содержит последовательности, выбранные из группы, состоящей из следующего:

(i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR), характеризующейся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 или 40; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR), характеризующейся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18 или 48;

(ii) три HCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 10, и три LCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 18;

(iii) три HCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40, и три LCDR, содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 48;

(iv) комбинация аминокислотных последовательностей HCDR/LCDR под SEQ ID NO:12-14-16-20-22-24;

(v) комбинация аминокислотных последовательностей HCDR/LCDR под SEQ ID NO:42-44-46-50-52-54;

(vi) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 10 или 40; и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 18 или 48;

(vii) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 18; и

(viii) аминокислотная последовательность HCVR, содержащая SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность LCVR, содержащая SEQ ID NO: 48.

47. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1—44, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 45 или п. 46, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

48. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1—44, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 45 или п. 46.

49. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 48.

50. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 49.

51. Способ подавления роста опухоли из плазматических клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1—44, или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 45 или п. 46, или фармацевтической композиции по п. 47.

52. Способ по п. 51, где опухоль из плазматических клеток представляет собой множественную миелому.

53. Способ подавления роста опухоли у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1—44, или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п. 45 или п. 46, или фармацевтической композиции по п. 47, где опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, В-клеточного лейкоза, гепатоцеллюлярной карциномы, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, глиомы, или рака молочной железы, или другого вида рака, частично характеризующегося наличием CD38+ клеток.

54. Способ по любому из пп. 51—53, дополнительно предусматривающий введение второго терапевтического средства или схемы терапии.

55. Способ по п. 54, где второе терапевтическое средство представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к ВСМА/CD3.

56. Способ по п. 54, где второе терапевтическое средство представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к CD20/CD3.

57. Способ по п. 54, где второе терапевтическое средство или схема терапии предусматривает химиотерапевтическое лекарственное средство, алкилирующие ДНК средства, иммуномодуляторы, ингибиторы протеасом, ингибиторы гистондеацетилаз, лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток, другое биспецифическое антитело, которое взаимодействует с другим антигеном поверхности опухолевых клеток и антигеном Т-клетки или иммунной клетки, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым средством, ингибитор контрольной точки PD-1, PD-L1 или CTLA-4 или их комбинации.

58. Способ лечения пациента, страдающего множественной миеломой или другим В-клеточным злокачественным новообразованием, экспрессирующим ВСМА, предусматривающий введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1—44, или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п. 45 или п. 46, или фармацевтической композиции по п. 47.

59. Способ по п. 58, где В-клеточное злокачественное новообразование, экспрессирующее ВСМА, выбрано из группы, состоящей из макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфоплазмочитарной лимфомы и лимфомы Ходжкина.

60. Способ по любому из п. 58 или п. 59, дополнительно предусматривающий введение второго терапевтического средства.

61. Способ по п. 60, где второе терапевтическое средство представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к ВСМА/CD3.

62. Способ по п. 60, где второе терапевтическое средство или схема терапии предусматривает химиотерапевтическое лекарственное средство, алкилирующие ДНК средства, иммуномодуляторы, ингибиторы протеасом, ингибиторы гистондеацетилаз, лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток, другое биспецифическое антитело, которое взаимодействует с другим антигеном поверхности опухолевых клеток и антигеном Т-клетки или иммунной клетки, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым средством, ингибитор контрольной точки PD-1, PD-L1 или CTLA-4 или их комбинации.

63. Способ лечения пациента, страдающего CD38+ опухолью и/или опухолью, экспрессирующей ВСМА, предусматривающий введение субъекту выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1—44, или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п. 45 или п. 46, или фармацевтической композиции по п. 47 в комбинации с антителом к PD-1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

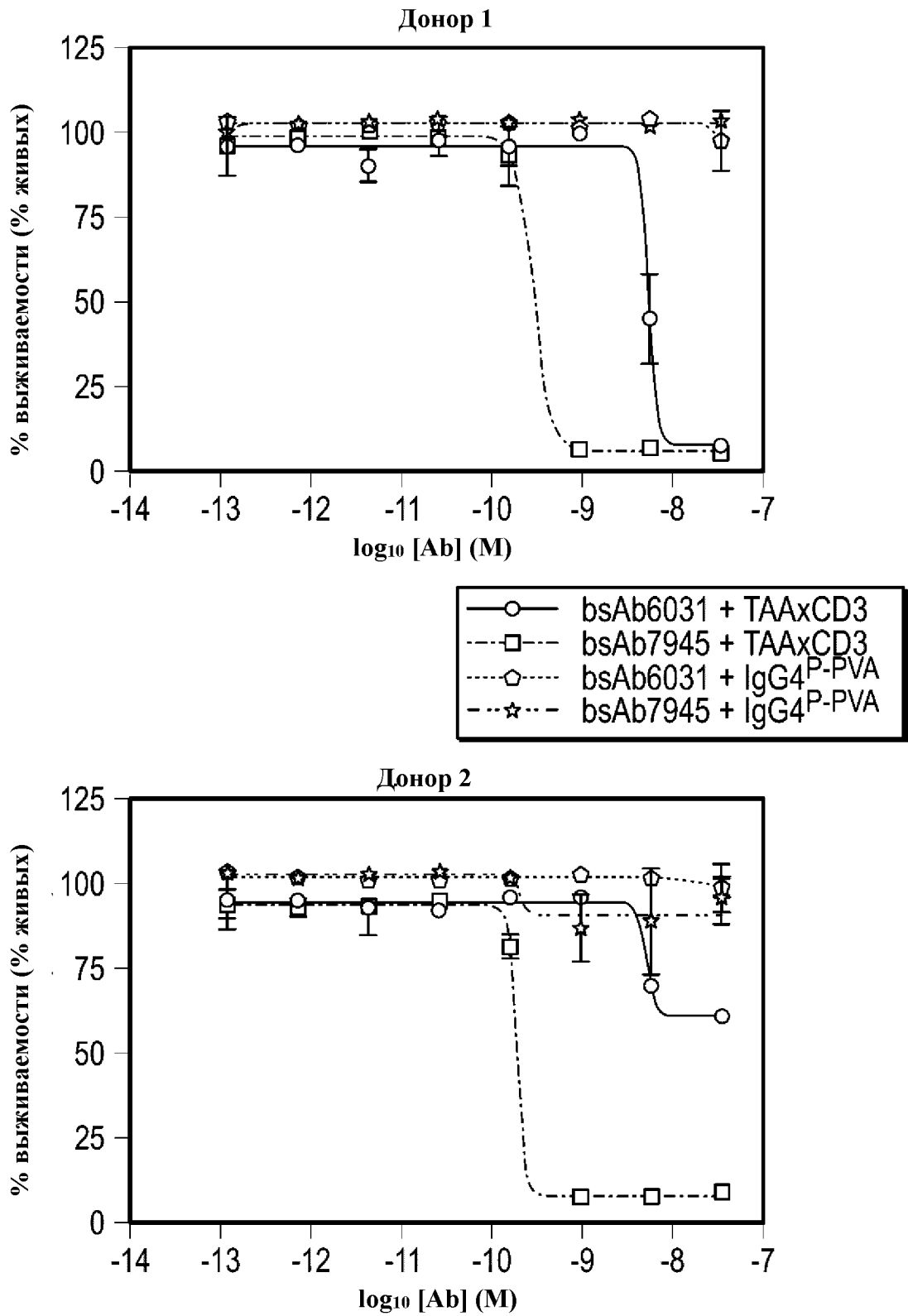
64. Способ по п. 63, где антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело к PD-1.

65. Способ по п. 64, где антитело к PD-1 представляет собой цемиплимаб (bsAb2810).

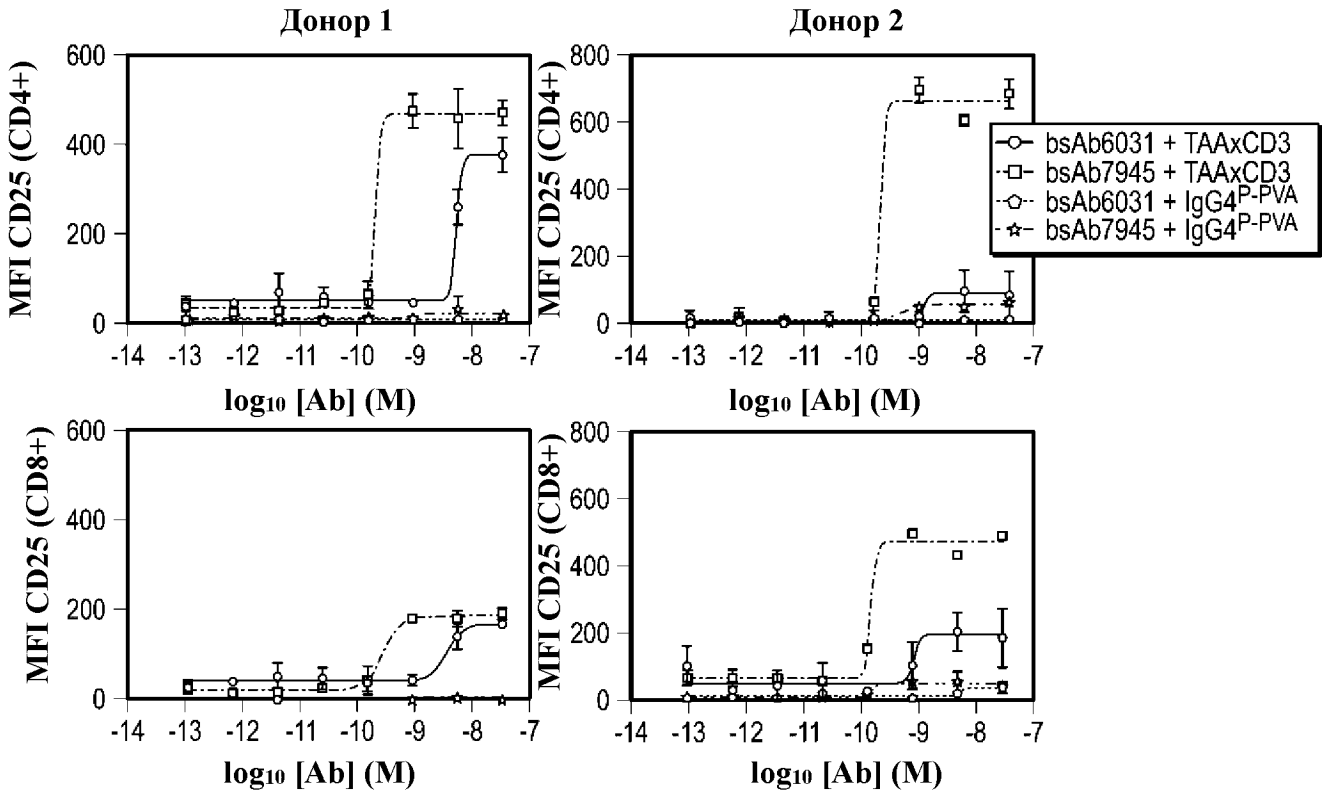
66. Применение выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1—44, или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п. 45 или п. 46, или фармацевтической композиции по п. 47 при лечении заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией CD38 и/или ВСМА.

67. Применение по п. 66, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

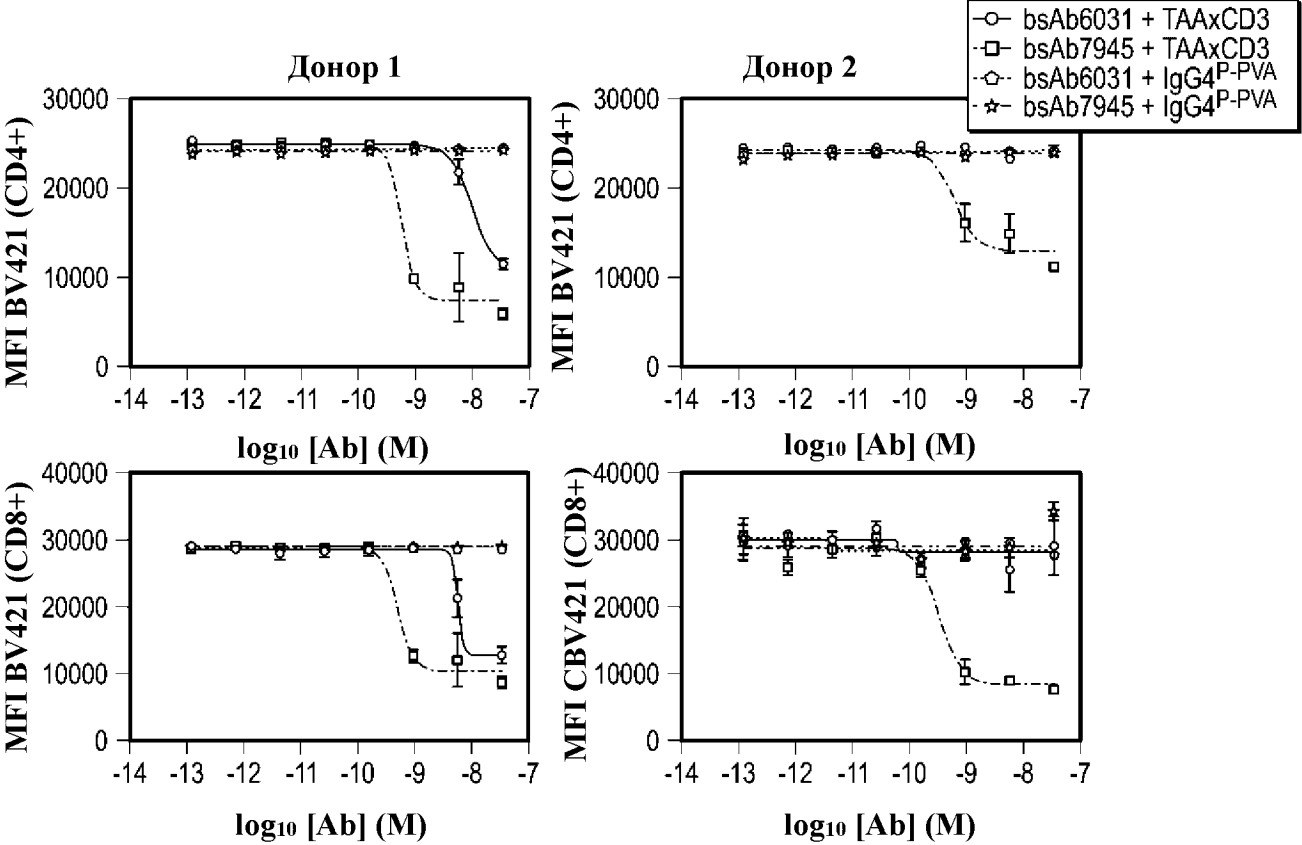
68. Применение по п. 67, где рак представляет собой множественную миелому.
69. Применение по любому из пп. 66—68, где антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинации с антителом к PD-1 или его антигенсвязывающим фрагментом.
70. Применение по п. 66, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, или фармацевтическая композиция вводится внутривенно, внутримышечно или подкожно.



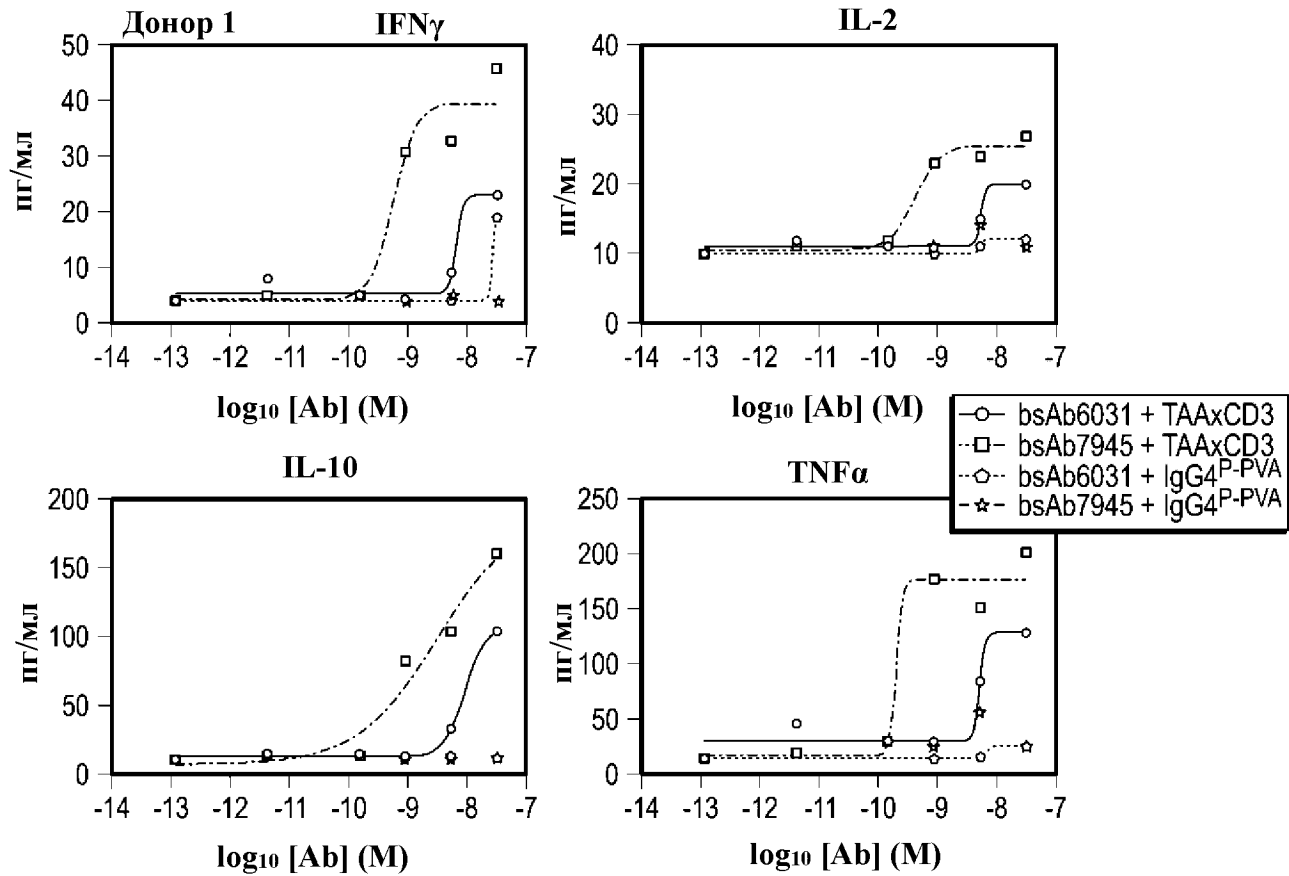
ФИГ. 1



ФИГ. 2

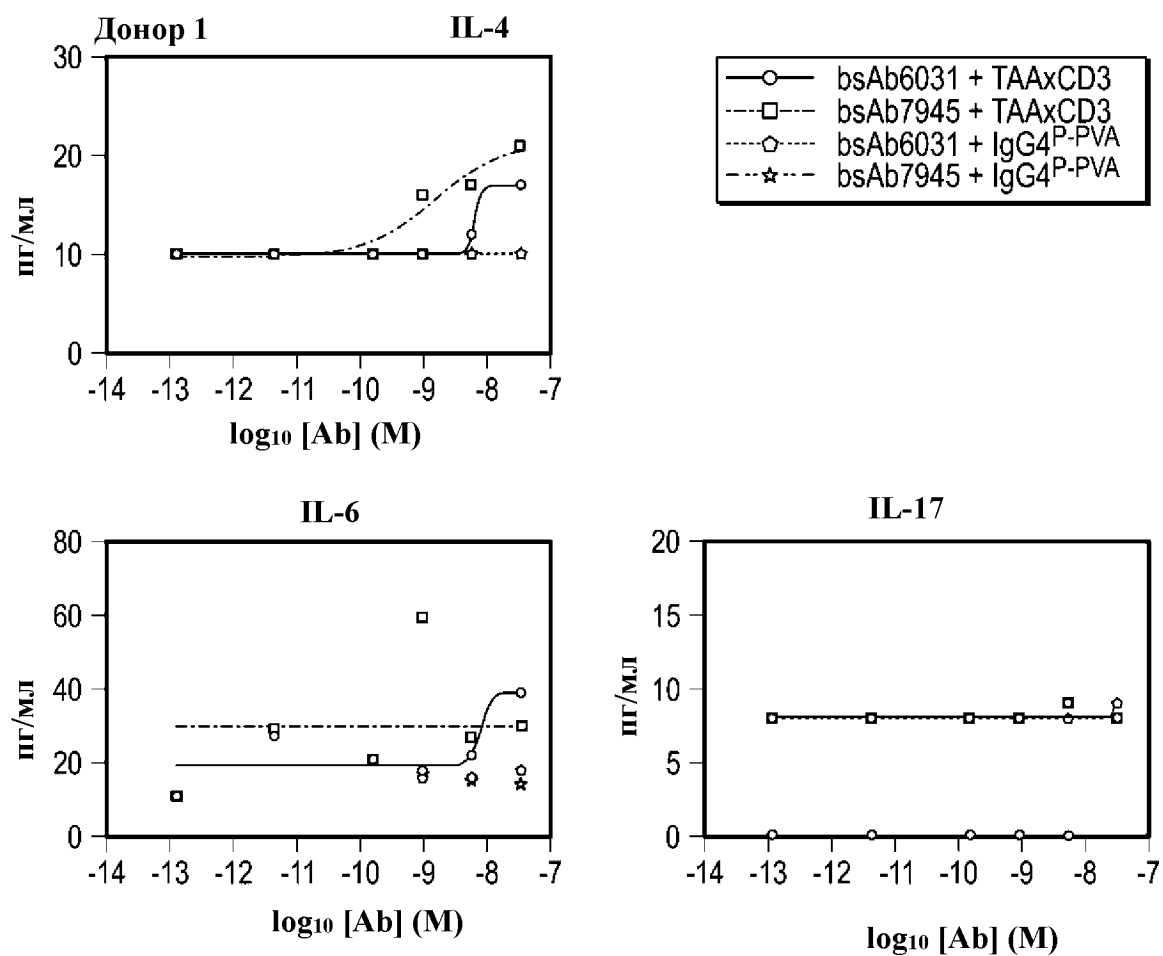


ФИГ. 3



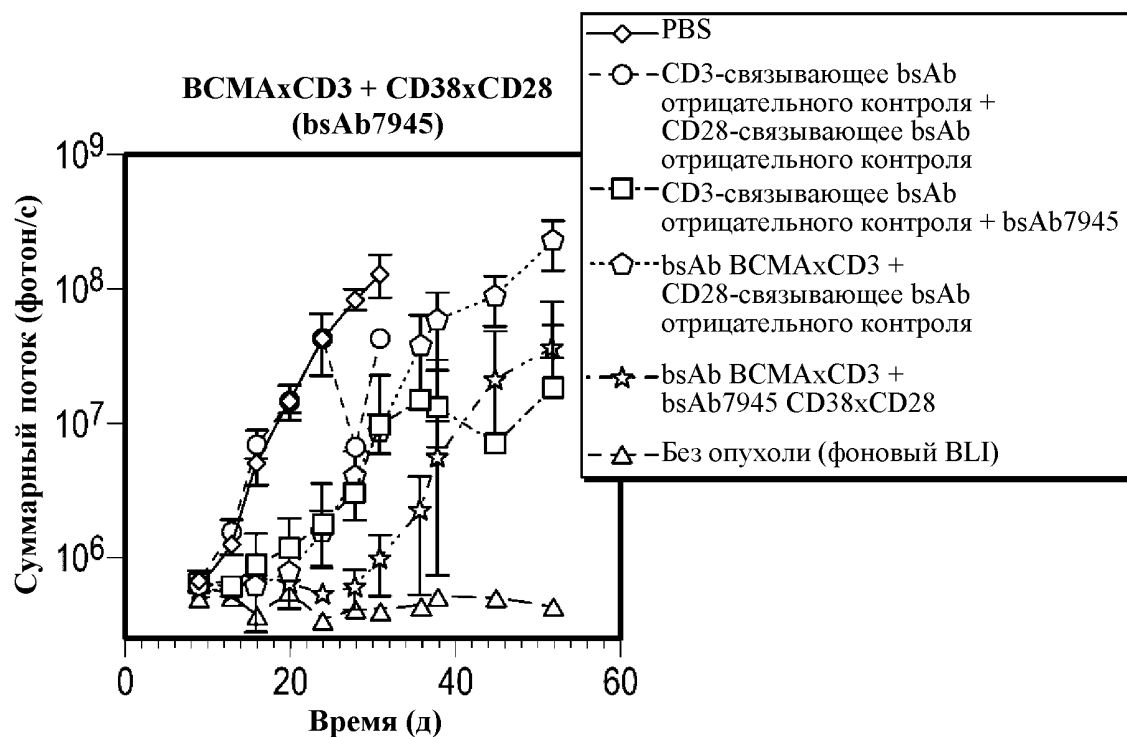
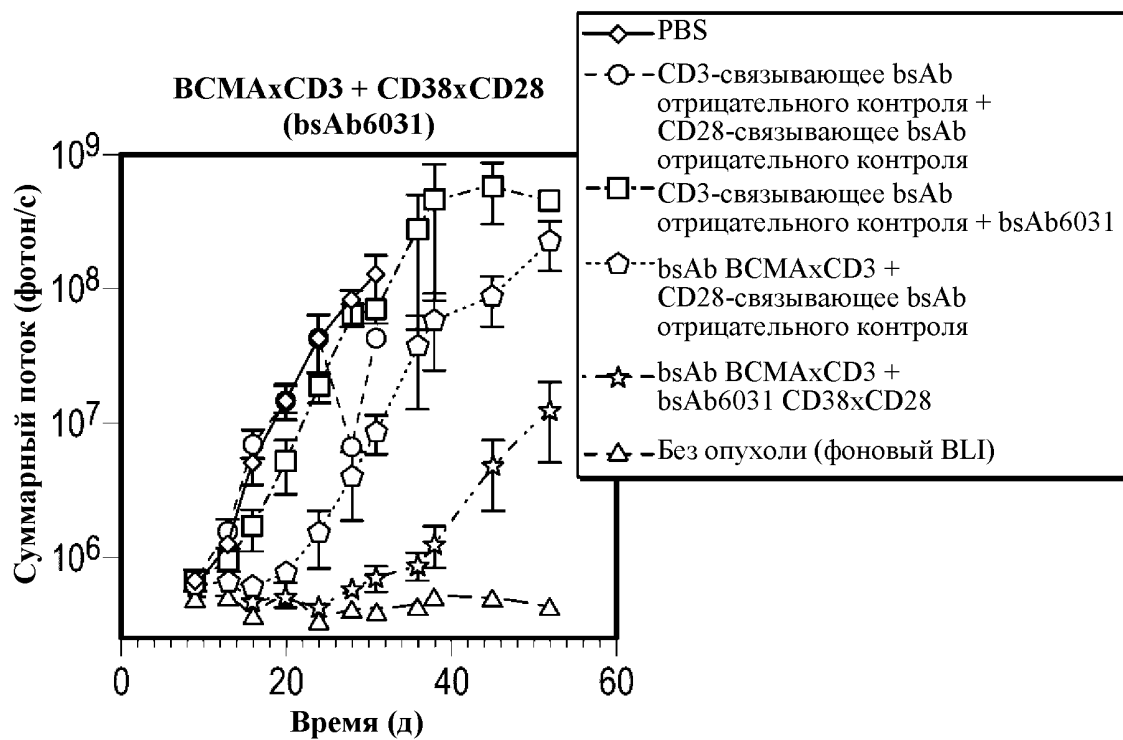
ФИГ. 4

5/12



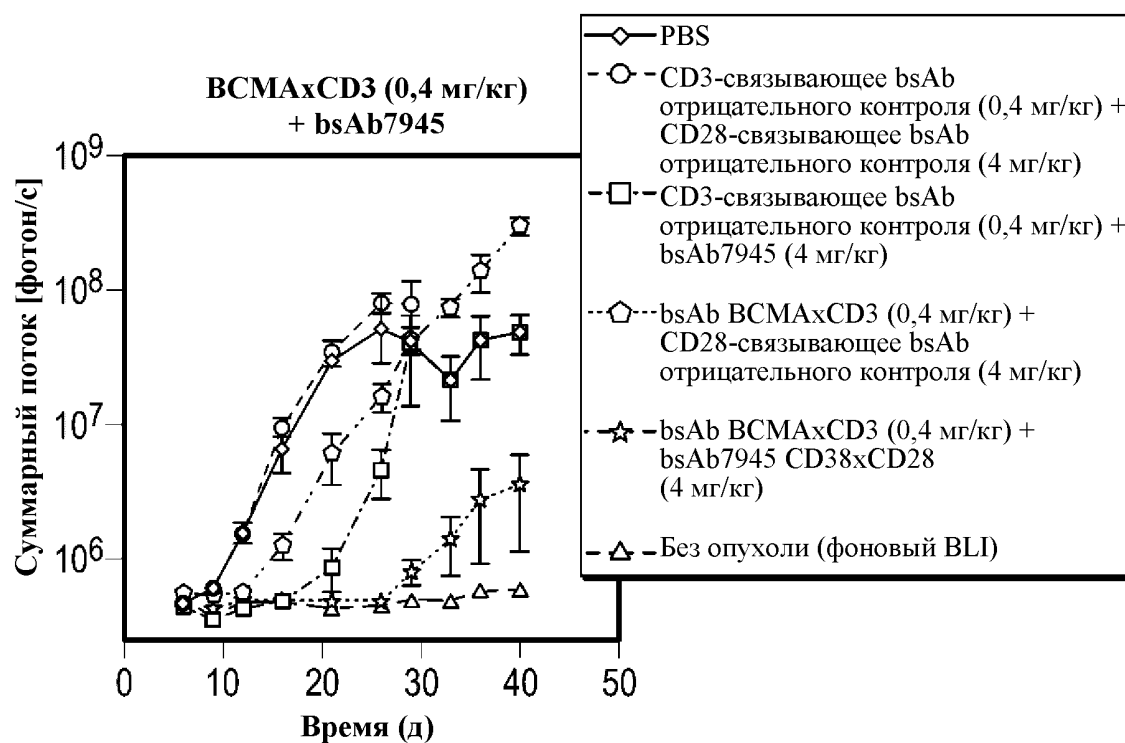
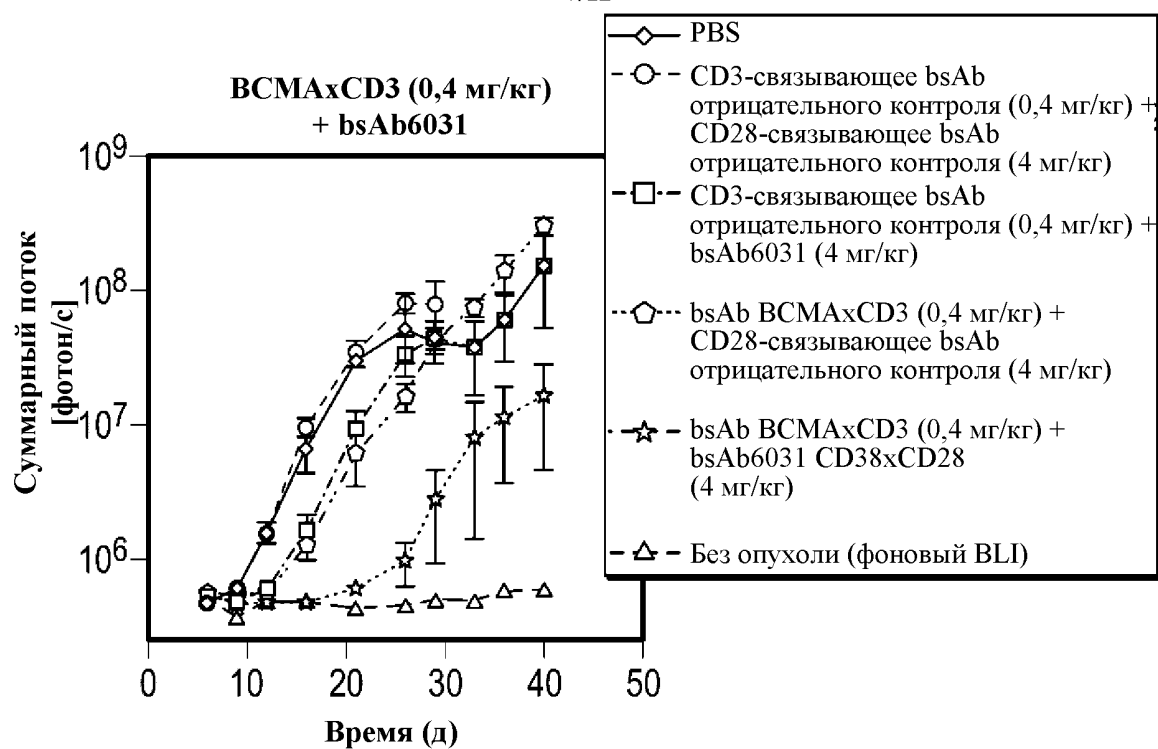
ФИГ. 4 (продолжение)

6/12



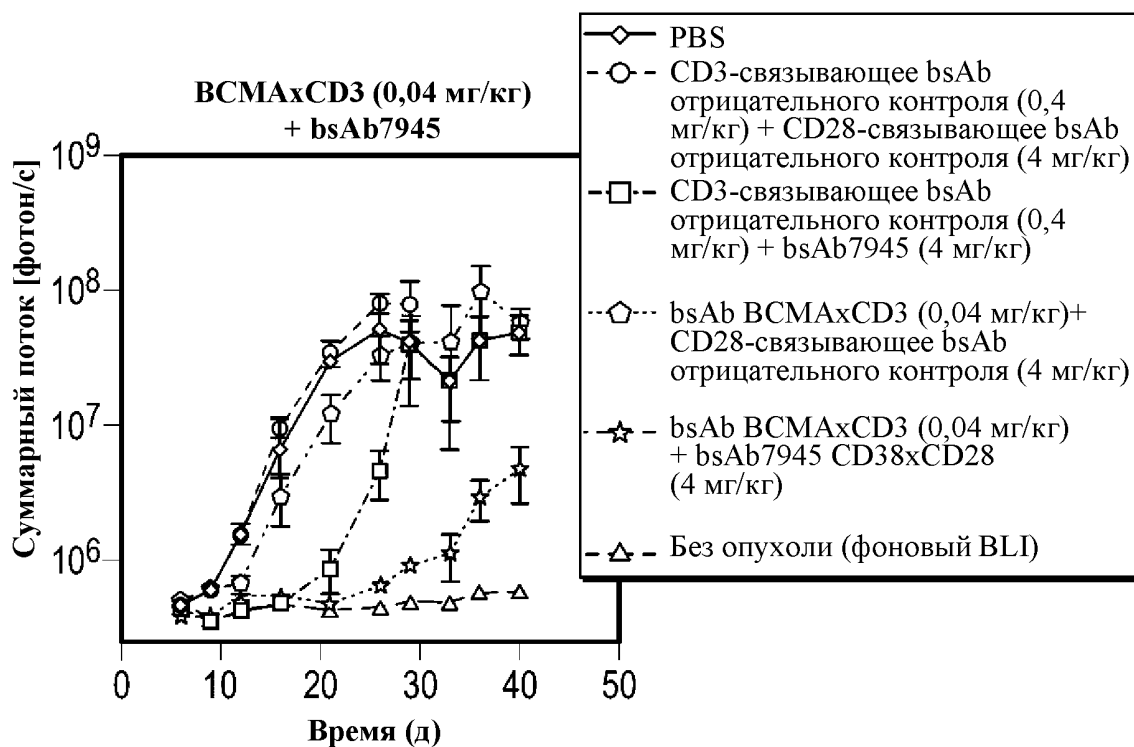
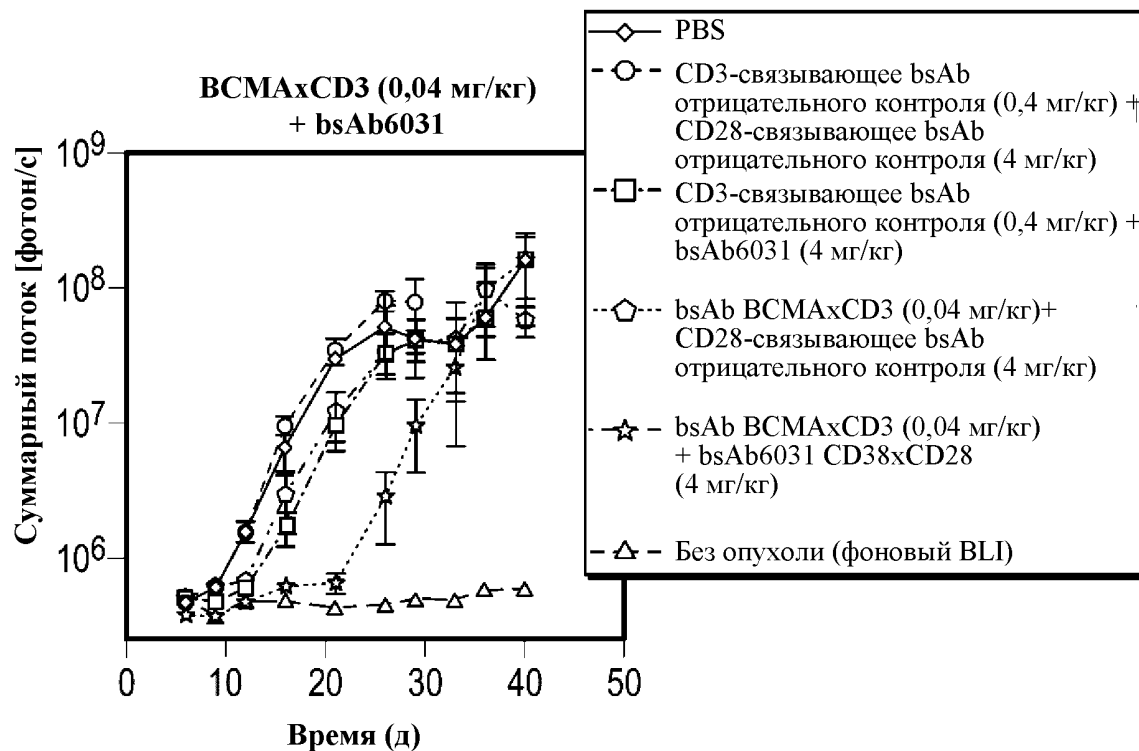
ФИГ. 5

7/12

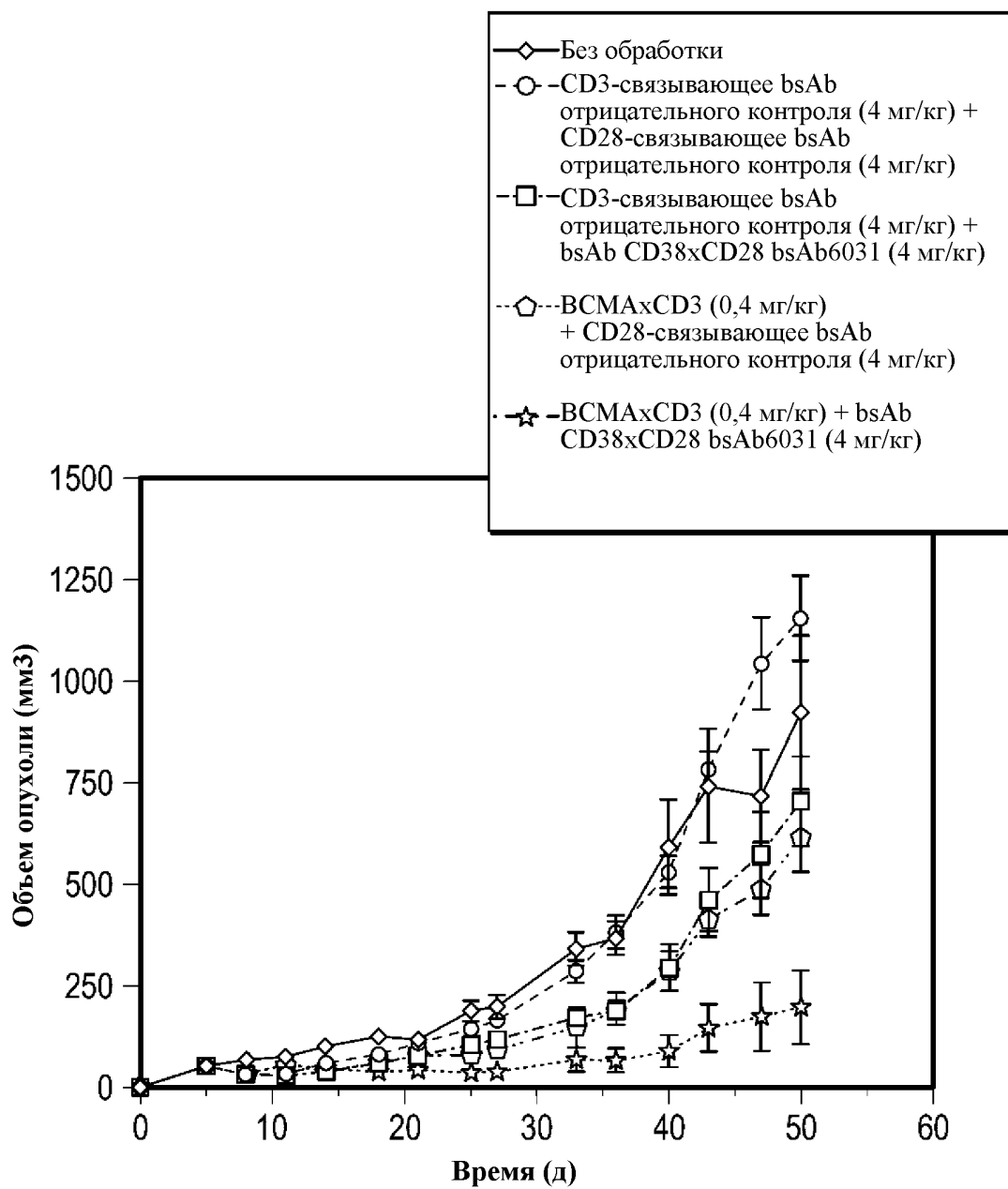


ФИГ. 6

8/12

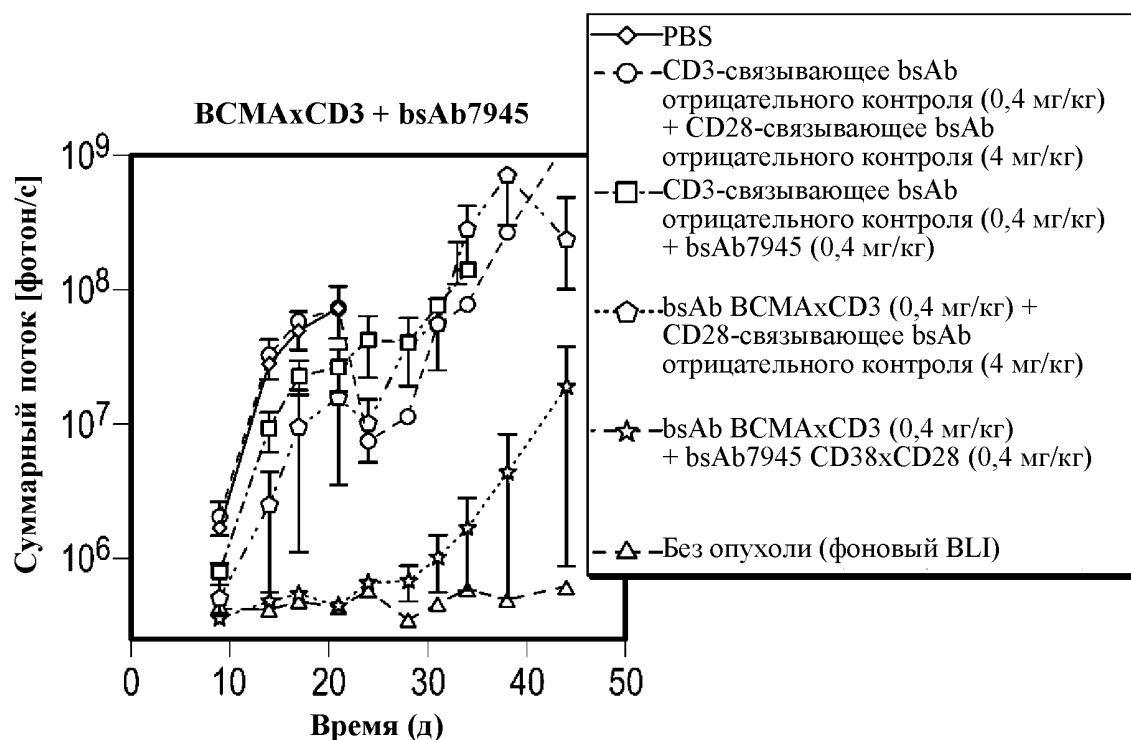
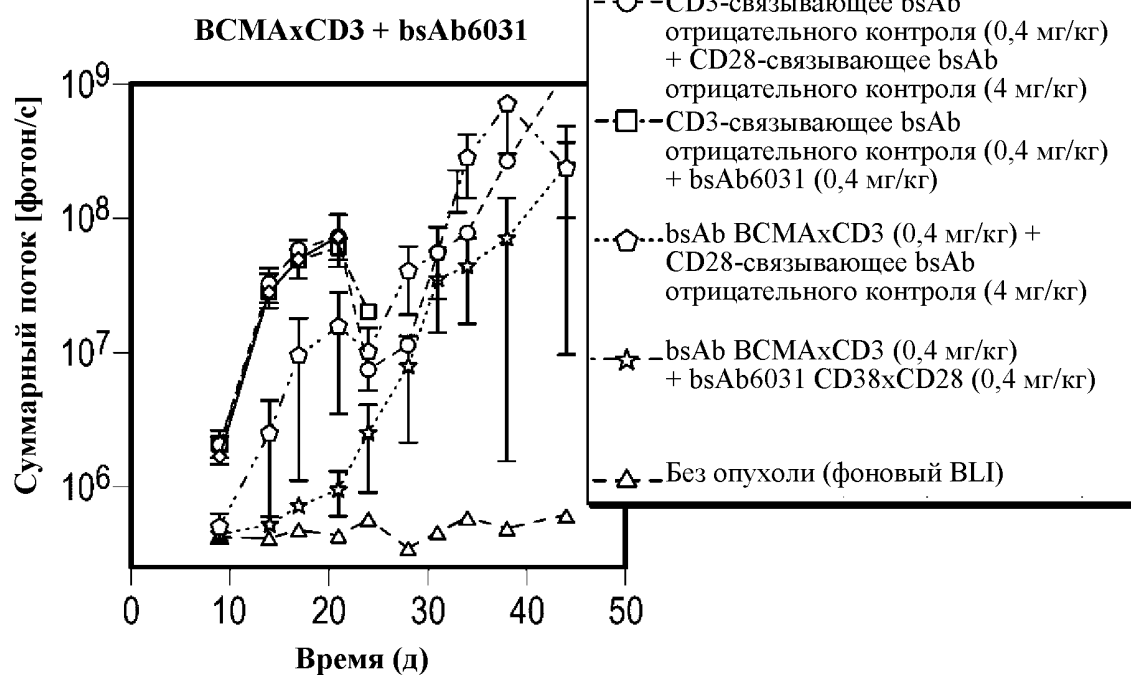


ФИГ. 6 (продолжение)



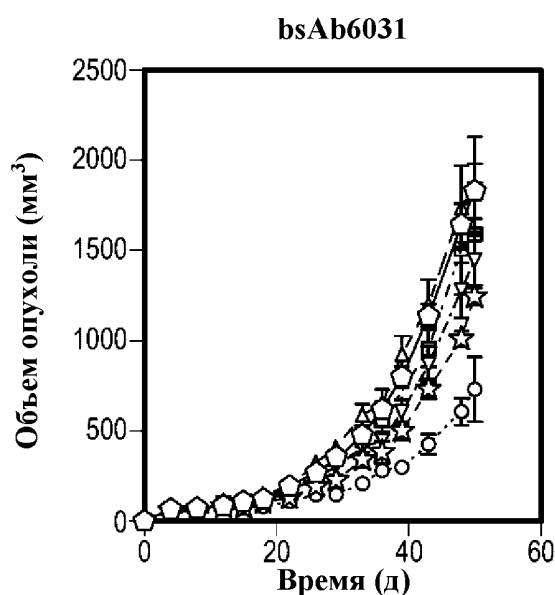
ФИГ. 7

10/12

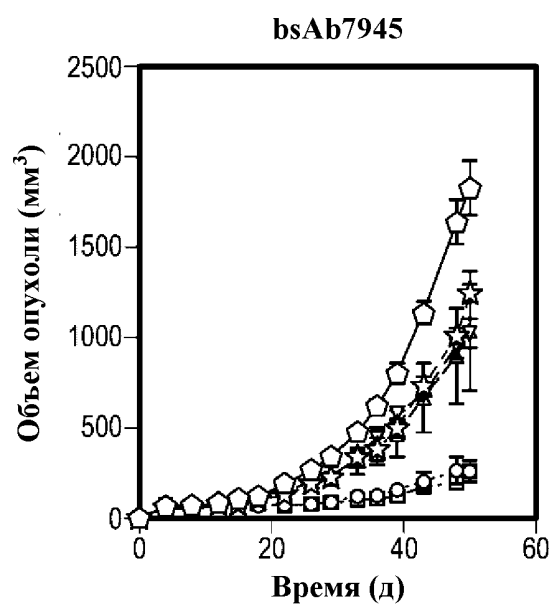


ФИГ. 8

11/12



- CD3-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг) + CD28-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг)
- ☆— bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг)
- ▽— CD3-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)
- bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (4 мг/кг)
- bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)
- △— bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb6031 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)



- CD3-связывающее контрольное bsAb (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг)
- ☆— bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + CD28-связывающее контрольное bsAb (4 мг/кг)
- ▽— CD3-связывающее контрольное bsAb (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)
- bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (4 мг/кг)
- bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,4 мг/кг)
- △— bsAb BCMAxCD3 (0,4 мг/кг) + bsAb7945 CD38xCD28 (0,04 мг/кг)

ФИГ. 9

12/12

