

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042851**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.29

(21) Номер заявки
201990787

(22) Дата подачи заявки
2017.11.02

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К ВСМА И CD3 И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ В
ЛЕЧЕНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

(31) **16196874.8**

(32) **2016.11.02**

(33) **EP**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/EP2017/078109**

(87) **WO 2018/083204 2018.05.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭНГМАБ САРЛ (CH)

(56) EP-A1-2982692
EP-A1-3023437
WO-A1-2012066058

(72) Изобретатель:
**Бу Минх Диём (CH), Штрейн Клаус
(DE), Пайва Бруно Дэвид Лоуренсо,
Сан Мигель Изкуэдро Хесус Фернандл
(ES)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Путинцев
А.И., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к биспецифичному антителу, специфически связывающемуся с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) человека и с CD3ε человека (CD3) совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы.

B1

042851

042851

B1

Данное изобретение относится к биспецифическому антителу, специфически связывающемуся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3) совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы.

Уровень техники

В-клеточный антиген созревания человека, также известный как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, который преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках (Laabi et al., 1992; Madry et al., 1998). BCMA является негликозилированным трансмембранным белком типа III, который участвует в созревании, росте и выживании В-лимфоцитов. BCMA является рецептором двух лигандов суперсемейства ФНО: APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию), лиганда с высоким сродством к BCMA, и фактора активации В-лимфоцитов BAFF, лиганда с низким сродством к BCMA (THANK, BlyS, стимулятор В-лимфоцитов, TALL-1 и zTNF4). APRIL и BAFF демонстрируют структурное сходство и перекрывающуюся, но различную специфичность связывания с рецептором. Отрицательный регулятор TAC1 также связывается как с BAFF, так и с APRIL. Координированное связывание APRIL и BAFF с BCMA и/или TAC1 активирует фактор транскрипции NF-κB, и усиливает экспрессию способствующих выживанию членов семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) и отрицательную регуляцию способствующих апоптозу факторов (например, Bid, Bad, Bik, Bim и т.д.), таким образом ингибируя апоптоз и способствуя выживанию. Данное комбинированное действие способствует дифференциации В-лимфоцитов, пролиферации, выживанию и выработке антител (как описано в Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133).

Описаны антитела к BCMA, например, в Gras M-P. et al., Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, WO 200124811, WO 200124812, WO 2010104949 и WO 2012163805. Упомянутые антитела к BCMA и их применение для лечения лимфом и множественной миеломы, например, в WO 2002066516 и WO 2010104949. WO 2013154760 и WO 2015052538 относятся к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим фрагмент распознавания BCMA и фрагмент активации Т-лимфоцитов. Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther: 6 (2007) 3009-3018 относятся к анти-BCMA антителам с активностью блокирования лигандов, которые могут способствовать цитотоксичности клеточных линий множественной миеломы (MM), в виде не конъюгированных антител или в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство. Райан показал, что SG1, ингибирующее BCMA антитело, блокирует APRIL-зависимую активацию ядерного фактора κB дозозависимым образом *in vitro*. Райан также упомянул антитело SG2, которое незначительно ингибировало связывание APRIL с BCMA.

Не так давно было разработано большое разнообразие форм рекомбинантных биспецифических антител, например путем слияния, например, форма антитела IgG и одноцепочечные домены (смотрите, например, Kontermann RE, mAbs4:2, (2012) 1-16). Биспецифические антитела, в которых вариабельные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменены друг на друга, описаны в WO 2009080251 и WO 2009080252.

Подход, позволяющий обойти проблему ошибочно спаренных побочных продуктов, который известен как "выступы в отверстия", направлен на то, чтобы вызвать спаривание двух различных тяжелых цепей антител путем внесения мутаций в домены CH3 для модификации интерфейса контакта. На одной цепи громоздкие аминокислоты замещают аминокислотами с короткими боковыми цепями, чтобы создать "отверстие". И наоборот, аминокислоты с большими боковыми цепями вносят в другой домен CH3, чтобы создать "выступ". Благодаря совместной экспрессии таких двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, которые должны подходить к обеим тяжелым цепям), наблюдают большее количество гетеродимерной конструкции ("выступ-отверстие") в сравнении с гомодимерными конструкциями ("отверстие-отверстие" или "выступ-выступ") (Ridgway JB, Presta LG, Carter P. Protein Eng. 9, 617-621 (1996); и WO 1996027011). Процент гетеродимера может быть дополнительно увеличен путем ремоделирования поверхностей взаимодействия двух доменов CH3 с использованием подхода фагового дисплея и введения дисульфидного мостика для стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; ATwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol. Biol 270 (1997) 26-35). Новые подходы в технологии "выступы в отверстия" описаны, например, в EP 1870459A1. Хотя такой формат кажется очень привлекательным, в настоящее время нет данных, описывающих прогресс в направлении применения в лечебной практике. Одно из важных ограничений такой стратегии представляет собой то, что легкие цепи двух исходных антител должны быть идентичными, чтобы предотвратить образование неправильных пар и формирование неактивных молекул. Таким образом, данный метод не подходит для простой разработки рекомбинантных, биспецифических антител к двум мишеням, начиная с двух антител к первой и второй мишеней, поскольку должны быть оптимизированы тяжелые цепи таких антител и/или идентичные легкие цепи. Xie Z., et al., J Immunol. Methods 286 (2005) 95-101 относится к форме биспецифического антитела с применением scFv в сочетании с технологией "выступы в отверстия" для части FC.

Комплекс TCR/CD3 Т-лимфоцитов состоит из альфа (α)/бета (β) TCR или гамма (γ)/дельта (δ) TCR

талидомидов для лечения множественной миеломы описано в Hideshima T. et al., Blood 96 (2000), 2943-2950.

Анти-CD38 антитела представляют собой, например, даратумумаб (US20150246123), изатаксимаб (US 8877899), MOR202 (WO 2012041800), и AB19 и AB79 (US 8362211). Анти-CD38 антитела также упоминаются в WO 2006099875, WO 2011154453, WO 2014068114 и WO 2007042309. Применение анти-CD38 моноклонального антитела в лечении множественной миеломы, например, обсуждено Lokhorst HM; N Engl J Med (2015) 373 1207-19.

Анти-PD-1 антитела представляют собой, например, пембролизумаб (Keytruda®, МК-3475), ниволумаб, пидилизумаб, ламбролизумаб, MEDI-0680, PDR001 и REGN2810. Анти-PD-1 антитела описаны, например, в WO 200815671, WO 2013173223, WO 2015026634, US 7521051, US 8008449, US 8354509, WO 2009114335, WO 2015026634, WO 2008156712, WO 2015026634, WO 2003099196, WO 2009101611, WO 2010/027423, WO 2010/027827, WO 2010/027828, WO 2008/156712 и WO 2008/156712.

Анти-PD-L1 антитела представляют собой, например, атезолизумаб, MDX-1105, дурвалумаб и авелумаб. Анти-PD-L1 антитела описаны, например, в WO 2015026634, WO 2013/019906, WO 2010077634, US 8383796, WO 2010077634, WO 2007005874 и WO 2016007235.

В WO 2012066058 в общих чертах упоминается биспецифический агент к ВСМА и CD3 также в комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов. Многие такие агенты перечислены и среди других упоминаются также производные талидомида, такие как леналидомид. В WO 2012143498 также в общих чертах упоминается терапия анти-ВСМА антителом для применения в лечении или устранении множественной миеломы и терапия анти-CD20 антителом и/или анти-CD38 антителом и/или анти-CS1 антителом. В WO 2016087531 раскрывается применение биспецифического антитела к ВСМА и CD3 вместе с пролиферативной терапией Т-лимфоцитов, относящейся к терапевтическому лечению или биологическому лечению, которое вызывает пролиферацию или размножение Т-лимфоцитов, например, ингибиторами контрольной точки (например, анти-PD-1, анти-PD-L1). WO 2016014565 относится к химерному рецептору антигена (CAR), специфичному к ВСМА, и в общих чертах к антителу или фрагменту антитела, что связывается с PD-1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4. Биспецифические антитела и соответствующие анти-ВСМА антитела согласно данному изобретению раскрыты в EP 15179549.9 и PCT/EP 2016/068549, сейчас ожидающие рассмотрения, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Сущность изобретения

Изобретение включает в себя биспецифическое антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (ВСМА) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы. Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления:

а) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (ВСМА), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3); и

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-антитела и анти-PD-L1-антитела, для совместного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления способ лечения множественной миеломы, характеризующийся введением пациенту, нуждающемуся в таком лечении:

а) биспецифического антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (ВСМА), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3); и

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,

- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления терапевтическую комбинацию для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, характеризующуюся тем, что содержит:

а) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3); и

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления набор, характеризующийся тем, что содержит:

а) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28 в фармацевтически приемлемом носителе;

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела;

в) фармацевтически приемлемый носитель и инструкции для введения указанного биспецифического антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления способ изготовления лекарственного средства, характеризующийся использованием:

а) биспецифического антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующегося тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28;

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела;

в) объединения указанного биспецифического антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в фармацевтически приемлемом носителе.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

Биспецифические антитела и иммунотерапевтические лекарственные средства, описанные в данном документе, предназначены для использования:

- а) в комбинированном применении в лечении множественной миеломы согласно изобретению;
- б) в способе лечения множественной миеломы согласно изобретению;
- с) в терапевтической комбинации для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, согласно изобретению;
- д) в наборе согласно изобретению и
- е) в способе изготовления лекарственного средства согласно изобретению. Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-CD38 антитело, выбранное из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба (SAR650984), MOR202, Ab79 (Takeda) и Ab19 (Takeda).

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой соединение талидомида, выбранное из группы, состоящей из талидомида, леналидомида, СС-122, СС-220 и помалидомида.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из группы, состоящей из пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16 и h409A17.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из группы, состоящей из авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба и MDX-1105.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой леналидомид и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой СС-122 или СС-220 и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой пембролизумаб и указанная первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой леналидомид и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 13 или область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой СС-122 или СС-220 и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 13 или область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 13 или область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 14.

Изобретение включает в себя в одном варианте осуществления то, что указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой пембролизумаб и первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 13 или область VH

SEQ ID NO: 10 и область VL SEQ ID NO: 14.

Первая связывающая часть согласно данному изобретению содержит в качестве областей CDR3H и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10 (по антителу 83A10 см. табл. 1А и В далее в тексте).

Первая связывающая часть согласно данному изобретению содержит в одном варианте осуществления в качестве областей CDR3H и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10, но демонстрирует особенно действенные и целесообразные преимущества по сравнению с антителом 83A10, для уничтожения клеток ММ в аспиратах костного мозга пациента.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO: 17 и область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24;
- б) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26;
- в) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28;
- г) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32;
- д) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32 и
- е) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24;
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- в) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления аминокислота 49 представляет собой E в SEQ ID NO: 12, S в SEQ ID NO: 13 или H в SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14, причем аминокислота 74 представляет собой треонин (T) или аланин (A). В одном варианте осуществления аминокислота 74 представляет собой A в SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть содержит в качестве областей CDR3H, CDR1L, CDR2L и CDR3L те же области CDR, что и антитело 83A10. Изобретение включает в себя моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 31, область CDR2L SEQ ID NO: 32 и область CDR3L SEQ ID NO: 20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30;
- б) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35 или
- в) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL SEQ ID NO: 12 и область VH, выбранную из группы, что состоит из областей VH SEQ ID NO: 38, 39 и 40. В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL SEQ ID NO: 12, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления аминокислота 49 представляет собой E. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VL область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве об-

ласти VL область VL SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 39 и 40. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 38, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 39, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 40, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть дополнительно характеризуется тем, что она также специфически связывается с ВСМА яванского макака. В одном варианте осуществления антитело согласно данному изобретению демонстрирует в отношении связывания с ВСМА различие в аффинности для яванского макака/человека в интервале от 1,5 до 5, или от 1,5 до 10, или от 1,5 до 16 (табл. 5).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что оно также специфически связывается с CD3 яванского макака. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 антитело демонстрирует различие для яванского макака/человека для Mab CD3 в интервале от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть представляет собой антитело с частью Fc или без части Fc, включая мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), такой как вовлекающий биспецифический активатор Т-лимфоцитов, диатело, или tandemный scFv, миметик антитела, такой как DARPIn, не конъюгированное моноспецифическое антитело, или конъюгат антитело-лекарственное средство. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, вовлекающий биспецифический активатор Т-лимфоцитов, диатело или tandemный scFv специфически связывается с ВСМА и CD3.

На основе первой связывающей части можно создавать конъюгаты антитело-лекарственное средство к ВСМА и мультиспецифические или биспецифические антитела к ВСМА и CD3 в различных формах, с или без части Fc, известной в данной области техники (см., например, выше "уровень техники"), одноцепочечные варибельные фрагменты (scFv), такие как вовлекающие биспецифические активаторы Т-лимфоцитов, диатела, tandemные scFv, и миметики антител, такие как DARPins, все они также являются вариантами осуществления изобретения. Формы биспецифических антител хорошо известны в данной области техники и, например, также описаны в Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126-1136, и Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010), и Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что VL ВСМА выбирают из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит в качестве области VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14, причем аминокислоту 49 выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H). В одном варианте осуществления аминокислота 49 представляет собой E (SEQ ID NO: 12), S (SEQ ID NO: 13) или H (SEQ ID NO: 14). В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14, причем аминокислота 74 представляет собой треонин (T) или аланин (A). В одном варианте осуществления аминокислота 74 представляет собой A в SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления изобретения первая связывающая часть характеризуется тем, что содержит VH ВСМА, содержащую область CDR3H SEQ ID NO: 17, и VLBCМА, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 31, область CDR2L SEQ ID NO: 32 и область CDR3L SEQ ID NO: 20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- a) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30;
- b) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35 или
- c) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37.

Биспецифическое антитело к ВСМА и CD3 характеризуется в одном варианте осуществления тем, что содержит:

а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с одной из указанных мишеней: CD3 и ВСМА; и

б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с другой из указанных мишеней, причем вариабельные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 заменены друг другом.

В одном варианте осуществления домен VH указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-ВСМА антитела. В одном варианте осуществления домен VL указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-ВСМА антитела.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит не больше чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab части анти-ВСМА антитела и не больше чем одну часть Fc, в одном варианте осуществления части Fc человека. В одном варианте осуществления не больше чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела и не больше чем один фрагмент Fab части анти-ВСМА антитела соединяют с частью Fc, и соединение осуществляют посредством С-концевого связывания фрагмента(тов) Fab с шарнирной областью. В одном варианте осуществления второй фрагмент Fab части анти-ВСМА антитела соединяют через его С-конец либо с N-концом фрагмента Fab части анти-CD3 антитела, либо с шарнирной областью части Fc и, следовательно, между частью Fc и частью анти-CD3 антитела. Предпочтительные биспецифические антитела показаны на фиг. 1-3.

Особенно предпочтительными являются биспецифические антитела, содержащие только фрагменты Fab и часть Fc, как указано, с или без "аминокислотной замены": Fab ВСМА-Fc-Fab CD3 (биспецифическая форма, фиг. 1А или 1В), Fab ВСМА-Fc-Fab CD3-Fab ВСМА (биспецифическая форма, фиг. 2А или 2В), Fab ВСМА-Fc-Fab ВСМА-Fab CD3 (биспецифическая форма, фиг. 2С или 2D), Fc-Fab CD3-Fab ВСМА (биспецифическая форма, фиг. 3А или 3В), Fc-Fab ВСМА-Fab CD3 (биспецифическая форма, фиг. 3С или 3D). Как показано на фиг. 1-3, "Fab ВСМА-Fc", "Fab ВСМА-Fc-Fab CD3" и "Fab ВСМА-Fc-Fab CD3" означает, что фрагмент(ы) Fab соединен(соединяют) через его(их) С-конец с N-концом фрагмента Fc. "Fab CD3-Fab ВСМА" означает, что фрагмент Fab CD3 соединяют его N-концом с С-концом фрагмента Fab ВСМА. "Fab ВСМА - Fab CD3" означает, что фрагмент Fab ВСМА соединяют его N-концом с С-концом фрагмента Fab CD3.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит второй фрагмент Fab указанного анти-ВСМА антитела, соединенного его С-концом с N-концом части антитела к CD3 указанного биспецифического антитела. В одном варианте осуществления домен VL указанной первой части анти-CD3 антитела соединяют с доменом CH1 или CL указанного второго анти-ВСМА антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит второй фрагмент Fab указанного анти-ВСМА антитела, соединенный его С-концом с частью Fc (подобно первому фрагменту Fab указанного анти-ВСМА антитела) и соединенный его N-концом с С-концом части антитела к CD3. В одном варианте осуществления домен CH1 указанной части анти-CD3 антитела соединяют с доменом VH указанной второй части анти-ВСМА антитела.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит часть Fc, соединенную ее N-концом с С-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит часть Fc, соединенную ее первым N-концом с С-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3, и второй фрагмент Fab указанного анти-ВСМА антитела, соединенный его С-концом с вторым N-концом части Fc. В одном варианте осуществления домен CL фрагмента Fab антитела к CD3 соединен с шарнирной областью части Fc. В одном варианте осуществления домен CH1 фрагмента Fab антитела к ВСМА соединен с шарнирной областью части Fc.

Фрагменты Fab соединены друг с другом с помощью подходящего линкера в соответствии с уровнем техники. В одном варианте осуществления используется линкер (Gly4-Ser1)3 (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Поскольку линкер представляет собой пептидный линкер, такое ковалентное соединение обычно осуществляют биохимическим рекомбинантным способом, используя нуклеиновую кислоту, кодирующую домены VL и/или VH соответствующих фрагментов Fab, линкер и, если необходимо, цепь части Fc.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело к ВСМА и CD3 характеризуется тем, что вариабельный домен VH части анти-CD3 антитела (далее называемый "VH CD3") содержит CDR тяжелой цепи - SEQ ID NO: 1, 2 и 3 в виде соответствующих CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи, и вариабельный домен VL части анти-CD3 антитела (далее называемый "VL CD3") содержит CDR легкой цепи - SEQ ID NO: 4, 5 и 6 в виде соответствующих CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что вариабельные домены части анти-CD3ε-антитела представляют собой SEQ ID NO: 7 и 8.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что часть анти-CD3 антитела (вторая связывающая часть биспецифического антитела) соединяют ее N-концом с С-концом части анти-ВСМА антитела (первая связывающая часть биспецифического антитела) и вариабельные домены VL и VH части анти-CD3 антитела или константные домены CL и CH1 заменяют друг другом.

В одном варианте осуществления домен VH указанной части анти-CD3 антитела соединяют с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела. В одном варианте осуществления домен VL указанной части анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 или CL указанной части анти-BCMA антитела.

Такая часть антитела в одном варианте осуществления представляет собой фрагмент Fab соответствующего антитела.

В дополнительном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело, в котором вариабельные домены VL и VH в легкой цепи и соответствующей тяжелой цепи части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела заменяют друг другом, характеризуется тем, что содержит константный домен CL части анти-CD3 антитела или части анти-BCMA антитела, при этом аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и в соответствующем константном домене CH1 аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D). В одном варианте осуществления антитело является одновалентным для связывания CD3. В одном варианте осуществления в дополнение к аминокислотной замене в позиции 124 в константном домене CL, аминокислоту в позиции 123 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (далее называемая "вариантом по заряду"). В одном варианте осуществления антитело является моновалентным для связывания CD3, и аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело дополнительно содержит ту же анти-BCMA связывающую часть в еще одном экземпляре (в одном варианте осуществления фрагмент Fab). Это также означает, что если первая анти-BCMA связывающая часть содержит вариант по заряду, то вторая анти-BCMA связывающая часть содержит тот же вариант по заряду. (Все порядковые номера аминокислот представлены согласно Кабату). В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что содержит:

- а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с BCMA; и
- б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом вариабельные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и
- с) причем в константном домене CL первой легкой цепи а) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата) и при этом в константном домене CH1 первой тяжелой цепи а) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, фиг. 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

В одном варианте осуществления указанное биспецифическое антитело, описанное в последнем предыдущем абзаце, дополнительно характеризуется тем, что указанное биспецифическое антитело дополнительно содержит фрагмент Fab указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 124 замещают независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (смотрите, например, фиг. 2A, 2C).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что содержит:

- а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с BCMA; и
- б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом вариабельные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и при этом
- с) в константном домене CL второй легкой цепи б) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата) и при этом в константном домене CH1 второй тяжелой цепи б) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата).

В одном варианте осуществления, в дополнение к аминокислотной замене в позиции 124 в константном домене CL первой и второй легкой цепи, аминокислоту в позиции 123 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). В одном варианте осуществления в константном домене CL аминокислоту в позиции 124 замещают лизином (K), в константном домене CH1 аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают глутаминовой кислотой (E). В одном варианте осуществления дополнительно в константном домене CL аминокислоту в позиции 123 замещают аргинином (R).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из одного фраг-

мента Fab антитела, специфически связывающегося с CD3 (далее называемого также "CD3-Fab"), и одного фрагмента Fab анти-BCMA антитела (далее называемого также "BCMA-Fab"), и части Fc, причем CD3-Fab и BCMA-Fab соединены их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc. Либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит замену и CD3-Fab содержит кроссовер (фиг. 1А и 1В). В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из одного CD3-Fab и одного BCMA-Fab и части Fc, причем CD3-Fab и BCMA-Fab соединяют их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc, и второго BCMA-Fab, который соединяют его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (фиг. 2А и 2В). Особенно предпочтительным является биспецифическое антитело, содержащее BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, причем оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену, а CD3-Fab содержит кроссовер VL/VH (фиг. 2А). Особенно предпочтительным является биспецифическое антитело, состоящее из BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, причем оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену Q124K, E123R, K147E и K213E, а CD3-Fab содержит кроссовер VL/VH. Особенно предпочтительным является то, что оба BCMA-Fab содержат в качестве CDR антитела 21, 22 или 42, или в качестве VH/VL антитела 21, 22 или 42 (антитела 21, 22 и 42 см. табл. 1А и В далее в тексте).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из двух BCMA-Fab и части Fc, причем один BCMA-Fab и CD3-Fab соединены их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc и второй BCMA-Fab соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (фиг. 2А и 2В). В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из двух BCMA-Fab и части Fc, причем BCMA-Fab соединены их С-концами с шарнирной областью указанной части Fc и CD3-Fab, который соединен его С-концом с N-концом одного BCMA-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо оба BCMA-Fab содержат аминокислотную замену (фиг. 2С и 2D). В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из одного CD3-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и BCMA-Fab, который соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (фиг. 1А и 1В).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из одного CD3-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и BCMA-Fab, который соединен его С-концом с N-концом CD3-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (фиг. 3А и 3В).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело состоит из одного BCMA-Fab, который соединен его С-концом с шарнирной областью указанной части Fc, и CD3-Fab, который соединен его С-концом с N-концом BCMA-Fab. CD3-Fab содержит кроссовер, и либо CD3-Fab, либо BCMA-Fab содержит аминокислотную замену (фиг. 3С и 3D).

Фрагменты Fab химически соединены друг с другом с использованием подходящего линкера согласно уровню техники. В одном варианте осуществления используется линкер (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 и Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). Соединение двух фрагментов Fab осуществляют между тяжелыми цепями. Следовательно, С-конец CH1 первого фрагмента Fab соединен с N-концом VH второго фрагмента Fab (без кроссовера) или с VL (кроссовер). Соединение фрагмента Fab и части Fc осуществляют в виде соединения CH1 и CH2.

Первый и второй фрагмент Fab антитела, специфически связывающегося с BCMA, в одном варианте осуществления получены из одного и того же антитела и в одном варианте осуществления идентичны по последовательностям CDR, последовательностям варибельного домена VH и VL и/или последовательностям константного домена CH1 и CL. В одном варианте осуществления аминокислотные последовательности первого и второго фрагмента Fab антитела, специфически связывающегося с BCMA, являются идентичными. В одном варианте осуществления антитело к BCMA представляет собой антитело, содержащее последовательности CDR антитела 21, 22 или 42, антитело, содержащее последовательности VH и VL антитела 21, 22 или 42, или антитело, содержащее последовательности VH, VL, CH1, и CL антитела 21, 22 или 42. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит в качестве фрагментов Fab и части Fc не больше чем один фрагмент Fab анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab анти-BCMA антитела, и не больше чем одну часть Fc, в одном варианте осуществления часть Fc человека. В одном варианте осуществления второй фрагмент Fab анти-BCMA антитела соединен его С-концом либо с N-концом фрагмента Fab анти-CD3 антитела, либо с шарнирной областью части Fc. В одном варианте осуществления соединение выполняют между CH1 BCMA-Fab и VL CD3-Fab (кроссовер VL/VH).

В одном варианте осуществления часть антитела, специфически связывающаяся с CD3 человека, в одном варианте осуществления фрагмента Fab, характеризуется тем, что содержит варибельный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO: 1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и варибельный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO: 4, 5 и 6 легкой цепи, в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи анти-CD3ε антитела (CDR MAB CD3). В одном варианте осуществления часть антитела, специфически связывающаяся с CD3 человека, характе-

ризуется тем, что переменные домены имеют SEQ ID NO: 7 и 8 (VHVL MAB CD3).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело специфически связывается с внеклеточным доменом ВСМА человека и с CD3ε человека, характеризуется тем, что содержит набор тяжелой и легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из полипептидов:

- i) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 (2×); (набор 1 TCB антитела 21);
- ii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (2×) (набор 2 TCB антитела 22) и
- iii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57 (2×) (набор 3 TCB антитела 42).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что домен СН3 одной тяжелой цепи и домен СН3 другой тяжелой цепи пересекаются в интерфейсе, который содержит исходный интерфейс между доменами СН3 антитела; причем указанный интерфейс изменяют, чтобы способствовать формированию биспецифического антитела, при этом изменение характеризуется тем, что:

а) домен СН3 одной тяжелой цепи изменяют так, что в пределах исходного интерфейса домен СН3 одной тяжелой цепи, который пересекается с исходным интерфейсом домена СН3 другой тяжелой цепи в биспецифическом антителе, аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, в результате чего образуется выпуклость в пределах интерфейса домена СН3 одной тяжелой цепи, которая позиционируется в углублении в пределах интерфейса домена СН3 другой тяжелой цепи; и

б) домен СН3 другой тяжелой цепи изменяют так, что в пределах исходного интерфейса второго домена СН3, который пересекается с исходным интерфейсом первого домена СН3 в биспецифическом антителе, аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, в результате чего образуется углубление в пределах интерфейса второго домена СН3, в пределах которого позиционируется выпуклость в интерфейсе первого домена СН3.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело характеризуется тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T), валина (V).

В одном варианте осуществления, такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что оба домена СН3 дополнительно изменяют путем внесения цистеина (C) в виде аминокислоты в соответствующие позиции каждого домена СН3. В одном варианте осуществления такое биспецифическое антитело характеризуется тем, что один из константных доменов СН3 тяжелой цепи обеих тяжелых цепей заменяют константным доменом СН1 тяжелой цепи; и другой константный домен СН3 тяжелой цепи заменяют константным доменом CL легкой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит модифицированную часть Fc, индуцирующую клеточную гибель 20% или большего количества клеток, препарата клеток, экспрессирующих ВСМА, через 24 ч, при концентрации указанного антитела 100 нМ по АЗКЦ относительно контроля в идентичных условиях с использованием того же антитела с исходной частью Fc в качестве контроля. Такое антитело в одном варианте осуществления представляет собой не конъюгированное антитело.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой антитело с количеством фукозы 60% или меньше от общего количества олигосахаридов (сахаров) по Asn297 (см., например, US 20120315268).

В одном варианте осуществления часть Fc содержит аминокислотные замены, которые внесены в часть Fc человека и раскрыты в SEQ ID NO: 55 и 56. Дополнительным вариантом осуществления изобретения является химерный антигенный рецептор (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцита анти-ВСМА антитела совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы. В таком варианте осуществления анти-ВСМА антитело состоит из одноцепочечного домена VH и VL первой связывающей части, и трансмембранного дзета CD3 и эндодомена. Предпочтительно дзета-домен CD3 соединен через спейсер с С-концом указанного домена VL, а N-конец домена VL соединен через спейсер с С-концом указанного домена VH. Химерные антигенные рецепторы антител ВСМА, полезные трансмембранные домены и эндодомены, и способы их получения описаны, например, в Ramadoss NS. et al., J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015), Carpenter RO et al., Clin. Cancer Res. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013), WO 2015052538 и WO 2013154760.

В одном варианте осуществления изобретения, первая связывающая часть представляет собой Mab21, Mab22, Mab42, Mab27, Mab33 и Mab39 (для антител Mab 21, 22, 42, 27, 33, 39 см. табл. 1А и В далее в тексте), описанные в данном документе в виде их последовательностей CDR и/или последовательностей VH/VL вместе с описанными последовательностями CL и CH1 в качестве антиген-

связывающих фрагментов, особенно фрагментов Fab. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит или не содержит часть Fc, в частности форму 2+1, и тяжелая и легкая цепи биспецифического антитела, в частности, такие, как описано в табл. 1А.

Анти-BCMA антитело уменьшает количество, в биспецифической форме, в частности в форме 2+1, злокачественных плазматических клеток человека в аспиратах костного мозга с множественной миеломой (ММ) по меньшей мере на 80% после 48-часовой обработки в концентрации от 10 нМ до 1 фМ включительно. Анти-BCMA антитела были охарактеризованы в пэннинге библиотеки фагового дисплея варибельной тяжелой цепи (VH) и варибельной легкой цепи (VL) антитела 83A10 (библиотека VH, библиотека VL) с помощью 1-50 нМ BCMA яванского макака за 1-3 раунда и отборе варибельной легкой цепи и варибельной тяжелой цепи, которые обладают такими свойствами, как такой биспецифический связыватель Т-лимфоцитов. Предпочтительно пэннинг проводят в 3 раунда, используя 50 нМ BCMA яванского макака (суBCMA) для раунда 1, 25 нМ BCMA яванского макака для раунда 2 и 10 нМ BCMA яванского макака для раунда 3. Предпочтительно библиотеки рандомизированы либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи, либо по CDR1 и CDR2 тяжелой цепи. Предпочтительно идентифицируют легкую и тяжелую цепи, каждая из которых связывается в виде фрагмента Fab, содержащего, кроме того, соответствующий VH или VL антитела 83A10, с BCMA человека (huBCMA) с КД от 50 пМ до 5 нМ, и с BCMA яванского макака с КД от 0,1 до 20 нМ. Предпочтительно биспецифическая форма представляет собой форму согласно фиг. 2А, содержащую соответствующие константные домены VL и VH замещения Fab CD3 друг на друга, и аминокислотные замещения K213E и K147E в домене CH1, и аминокислотные замещения E123R и Q124K в домене CL в обоих вариантах Fab BCMA. Биспецифическое антитело, упомянутое в данном документе, может быть получено с помощью этапов:

- a) трансформации клетки-хозяина с помощью;
- b) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанной молекулы антитела;
- c) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и
- d) выделения указанной молекулы антитела из указанной культуры.

Биспецифическое антитело, упомянутое в данном документе, может быть получено с помощью этапов:

- e) трансформации клетки-хозяина с помощью;
- f) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первой мишенью;
- g) векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с второй мишенью, причем варибельные домены VL и VH, или константные домены CL и CH1, заменяют друг на друга;
- h) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и
- i) выделения указанной молекулы антитела из указанной культуры.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, и фармацевтически приемлемый носитель.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, для применения в качестве медикамента.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело, специфически связывающееся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA) и с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающаяся часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы: i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24, ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в качестве медикамента в лечении множественной миеломы.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело согласно данному изобретению содержит первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения, что может быть применено для лечения патологий плазматических клеток, таких как множественная миелома (ММ), или других патологий плазматических клеток, экспрессирующих BCMA, как описано ниже. ММ представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток, характеризующееся моноклональным распространением и накоплением аномальных плазматических клеток в костном мозге. ММ также включает в себя циркулирующие клональные плазматические клетки с одинаковой перестройкой гена IgG и соматической гипермутацией. ММ возникает из бессимптомного предракового состояния, называемого моноклональной гаммапатией неизвестной значимости (MGUS), характеризующегося низким уровнем плазматических клеток в костном мозге и моноклонального белка. ММ клетки пролиферируют с низкой скоростью. ММ возникает в результате прогрессирующего возникновения множественных структурных хромосомных изменений (например, несбалансированных транслокаций). ММ включает в себя обоюдное взаимодействие злокачественных плазматических клеток и микроокружения костного мозга (например, нормальных стромальных клеток костного мозга). Клинические признаки активной ММ включают в себя выброс моноклональных антител, переполнение костного мозга плазматическими клетками, литические поражения костей и разрушение костей в результате чрезмерной стимуляции остеокластов (Dimopoulos & Teggos, *Ann Oncol* 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Другая патология плазматических клеток с вовлечением плазматических клеток, т.е. экспрессирующих BCMA, представляет собой системную красную волчанку (СКВ), также известную как волчанка. СКВ - это системное аутоиммунное заболевание, которое может поражать любую часть тела и проявляется в том, что иммунная система атакует собственные клетки и ткани организма, что приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей. Это реакция гиперчувствительности типа III, при которой откладываются комплексы антитело-антиген и вызывают дальнейший иммунный ответ (Inaki & Lee, *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 326-337). Другие патологии плазматических клеток представляют собой плазмноклеточный лейкоз и AL-амилоидоз (см. также примеры 19 и 20). Ожидается, что при всех этих патологиях плазматических клеток будет полезным деплетирование плазматических клеток/злокачественных плазматических клеток антителами согласно данному изобретению для пациентов, страдающих от такого заболевания.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы: i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24, ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26, или iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28. Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающуюся часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы: i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24, ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27

и область CDR2L SEQ ID NO: 28. Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифическое антитело с усиленной эффекторной функцией, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифическое антитело с уменьшенной эффекторной функцией, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую указанное биспецифическое антитело в качестве диатела, совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для применения в качестве медикамента. Предпочтительно первая связывающая часть характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, вводят один или два раза в неделю в одном варианте осуществления посредством подкожного введения (например, в одном варианте осуществления в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно до 25 мг/м²/неделя, предпочтительно до 250 мг/м²/неделя). Благодаря превосходной цитотоксической активности биспецифического антитела их можно вводить, по меньшей мере, при той же величине диапазона клинических доз (или даже ниже) по сравнению с обычными моноспецифическими антителами или обычными биспецифическими антителами, которые не являются биспецифическими по отношению к Т-лимфоцитам (т.е. не связываются с CD3 одним плечом). Предусматривается, что для биспецифического антитела и иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, предпочтительным является подкожное введение в клинических условиях (например, в диапазоне доз от 0,1 до 250 мг/м²/неделя). Кроме того, для пациентов с высокими уровнями APRIL и BAFF в сыворотке (например, для пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличение дозы биспецифического антитела, поскольку на него может не влиять конкуренция с лигандом. Напротив, дозы для других лиганд-блокирующих/конкурирующих анти-BCMA антител, возможно, должны быть увеличены для таких пациентов. Другим преимуществом биспецифического антитела является период полужизни, составляющий примерно от 4 до 12 дней, который делает возможным введение по меньшей мере один или два раза в неделю. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело представляет собой антитело, свойства которого позволяют проводить лечение один/два раза в неделю внутривенным путем, но предпочтительно путем подкожного введения (например, дозировка в диапазоне 200-2000 мг/м²/неделя в течение 4 недель). Предусматривается, что для подкожного введения биспецифического антитела возможными и предпочтительными являются клинические условия (например, в диапазоне доз 200-2000 мг/м²/неделя, в зависимости от показаний по заболеванию). Кроме того, для пациентов с высоким уровнем APRIL и BAFF в сыворотке (например, для пациентов с множественной миеломой) может не потребоваться увеличение дозы биспецифического антитела (например, не блокирующего лиган-

ды/конкурирующего антитела), поскольку конкурирование с лигандом може не влиять на него. Напротив, дозы для других лиганд-блокирующих/конкурирующих анти-BCMA антител для таких пациентов, возможно, должны быть увеличены, что делает подкожное введение технически более сложным (например, фармацевтически). Другое преимущество биспецифического антитела основано на включении части Fc, которая связана с периодом полужизни от 4 до 12 дней и делает возможным введение по меньшей мере один или два раза в неделю.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Биспецифические бивалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано:

- (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3;
- (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE).

Аминокислотные замены RK/EE внесены в CL-CH1, чтобы уменьшить ошибочное спаривание/количество побочных продуктов при продуцировании LC.

Fab CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов.

Фиг. 2. Предпочтительные биспецифические трехвалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано:

- (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE);
- (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA;
- (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3;
- (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE).

Аминокислотные замены RK/EE внесены в CL-CH1 чтобы уменьшить LC ошибочное спаривание/количество побочных продуктов при продуцировании.

Предпочтительно Fab CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов. Предпочтительно Fab CD3 и Fab BCMA соединены друг с другом гибкими линкерами.

Фиг. 3. Биспецифические бивалентные антитела, содержащие только фрагменты Fab (специфические к CD3 и BCMA) и часть Fc, как указано:

- (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE);
- (B) Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA;
- (C) Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3;
- (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE).

Предпочтительно Fabs CD3 включает в себя кроссовер VL-VH, чтобы уменьшить ошибочное спаривание LC и количество побочных продуктов. Fab CD3 и Fab BCMA соединены друг с другом гибкими линкерами.

Фиг. 4. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток H929 MM, индуцированный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (BCMA×CD3-TCB), по данным измерения высвобождения ЛДГ (лактатдегидрогеназа). Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток MM H929, индуцированного 21-TCB_{scv} (закрашенный круг), 22-TCB_{scv} (закрашенный треугольник), 42-TCB_{scv} (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-TCB_{scv} (незакрашенный круг, пунктирная линия). Определение термина TCB или TCB_{scv} смотрите выше. TCB_{scv}, используемое в экспериментах, результаты которых показаны на фиг. с 4 по 16 и с 19 по 21, имело форму, показанную на фиг. 2A (sc означает аминокислотные замены с вариантом по заряду). Происходило зависимое от концентрации уничтожение клеток H929 для всех биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным TCB. Эксперименты проводили с донором 1 (A), донором 3 (B), донором 4 (C), донором 5 (D) МКПК с использованием соотношения эффекторных клеток к опухолевым клеткам-мишеням (E:T), составляющего 10 МКПК к 1 MM клетке (см. пример 8).

Фиг. 5. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток L363 MM, индуцированный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным измерения высвобождения ЛДГ. Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток L363 MM, индуцированного 21-TCB_{scv} (закрашенный круг), 22-TCB_{scv} (закрашенный треугольник), 42-TCB_{scv} (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-TCB_{scv} (незакрашенный круг, пунктирная линия). Наблюдали зависимое от концентрации уничтожение клеток L363 для всех биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным TCB. Эксперименты проводили с донором 1 (A), донором 2 (B), донором 3 (C), донором 4 (D), донором 5 (E) МКПК с использованием соотношения E:T, составляющего 10 МКПК к 1 MM клетке (см. пример 9).

Фиг. 6. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226 MM, индуцированный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным измерения высвобождения ЛДГ. Кривые зависимости ответа от концентрации для лизиса клеток RPMI-8226 MM, индуцированного 21-TCB_{scv} (закрашенный круг), 22-TCB_{scv} (закрашенный треугольник), 42-TCB_{scv} (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-TCB_{scv} (незакрашенный круг, пунктирная линия). Наблюдали зависимое от концентрации уничтожение клеток RPMI-8226 для всех биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-

лимфоцитов антител, в то время как уничтожение не наблюдали с контрольным ТСВ. Эксперименты проводили с донором 2 (А), донором 3 (В), донором 4 (С), донором 5 (D) МКПК с использованием соотношения Е:Т, составляющего 10 МКПК к 1 ММ клетке (см. пример 10).

Фиг. 7. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток JN-3 ММ, индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Зависимое от концентрации уничтожение клеток JN-3 ММ с помощью 22-ТСВсv (закрашенный треугольник), 42-ТСВсv (закрашенный квадрат) по сравнению с 83A10-ТСВсv (незакрашенный круг, пунктирная линия). Процент аннексин-V-положительных клеток JN-3 (А, С) и лизиса опухолевых клеток (В, D) были определены и нанесены на график. Процент лизиса клеток JN-3, вызванный определенной концентрацией биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела, определяли следующим образом: абсолютное количество аннексин-V-негативных клеток JN-3 при данной концентрации ТСВ и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-негативных клеток JN-3 без ТСВ; деля на абсолютное количество аннексин-V-негативных клеток JN-3 без ТСВ. Эксперименты проводили с 2 донорами МКПК: донором 1 (А, В) и донором 2 (С, D) с использованием соотношения Е:Т, составляющего 10 МКПК к 1 клетке ММ (см., пример 11).

Фиг. 8. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующихся Т-лимфоцитов костного мозга (аспирааты цельного костного мозга пациента), индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным мультипараметрической проточной цитометрии. Процент аннексин-V-положительных миеломных плазматических клеток определяли и наносили на график в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали лизис Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-лимфоцитов исходя из 8-цветной мультипараметрической панели. Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ. По сравнению с 83A10-ТСВсv (А), 42-ТСВсv (В) и 22-ТСВсv (С) были более эффективными в индукции клеточной гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента (см. пример 13).

Фиг. 9. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующихся Т-лимфоцитов костного мозга (аспирааты цельного костного мозга пациента), индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Процент аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток определяли и наносили на график в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали лизис незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ (данные не показаны). По сравнению с 83A10-ТСВсv, 42-ТСВсv и 22-ТСВсv были более эффективными в индуцировании уничтожения миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, что отражалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (аннексин-V-отрицательных) миеломных плазматических клеток. Репрезентативные эксперименты на пациенте 001 (А) и пациенте 007 (В) (см. пример 13).

Фиг. 10. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга пациента с множественной миеломой в присутствии аутологичных инфильтрирующихся Т-лимфоцитов костного мозга, индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Определяли процент миеломных плазматических клеток с отрицательной реакцией на пропидий йодид и наносили на график процент жизнеспособных плазматических клеток костного мозга относительно контроля в виде питательной среды (МС) в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали (А-Г) зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали (H) лизис микросреды костного мозга (ВММЕ) (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ. По сравнению с 83A10-ТСВсv, 42-ТСВсv и 22-ТСВсv были более эффективными в индуцировании уничтожения миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, что отражалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (отрицательных по пропидий йодиду) миеломных плазматических клеток. Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**), или <0,1% (***). Эксперименты проводились с использованием аспирированных образцов костного мозга, взятых у пациента 1 (А), пациента 2 (В), пациента 3 (С), пациента 4 (D), пациента 5 (Е), пациента 6 (F) и пациента 7 (G, H) (см. пример 13).

Фиг. 11. Активация Т-лимфоцитов костного мозга пациента с миеломой в присутствии плазматических клеток костного мозга (аспирааты цельного костного мозга пациента), индуцированная биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным мультипараметрической проточной цитометрии (8-цветная панель окрашивания). Величину активации Т-лимфоцитов сравнивали между 83A10-ТСВсv (А), 42-ТСВсv (В) и 22-ТСВсv (С) (см. пример 14).

Фиг. 12. Концентрации 83A10-TCVscv, измеренные в образцах сыворотки (закрашенные символы с цельными линиями) и образцах костного мозга (незакрашенные символы с пунктирными линиями) после однократного внутривенного (в/в) введения яванским макакам 0,003, 0,03 и 0,1 мг/кг 83A10-TCVscv. Сбор образцов сыворотки проводили до введения дозы и через 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после дозирования. Образцы костного мозга собирали до введения дозы и через 96 и 336 ч после введения дозы (см. пример 16).

Фиг. 13. Перераспределение периферических Т-лимфоцитов, наблюдаемое у яванских макак после однократной внутривенной инъекции 83A10-TCVscv (0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг). Животные А и В, С и D, а также Е и F соответственно получали внутривенную инъекцию 0,003, 0,03 и 0,3 мг/кг 83A10-TCVscv. Абсолютное количество Т-лимфоцитов в крови (CD2⁺ клеток на мкл крови) наносили на график в зависимости от времени после обработки (см. пример 16).

Фиг. 14. Уменьшение уровня плазматических клеток крови, наблюдаемое у яванских макак после однократной внутривенной инъекции 83A10-TCVscv (0,3 мг/кг), по данным мультипараметрической точной цитометрии. Плазматические клетки (ПК) были идентифицированы на основе 6-цветной панели окрашивания, и процент ПК по сравнению с лимфоцитами был измерен и нанесен на контурные графики (А). Строили график кинетики деплетирования плазматических клеток крови после обработки 83A10-TCVscv 0,3 мг/кг у яванских макак (В) (см. пример 16).

Фиг. 15. Противоопухолевая активность, индуцированная биспецифическим анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителом 83A10-TCVscv в модели ксенотрансплантата миеломы человека H929 с использованием гуманизированных по МКПК мышей NOG. Иммунодефицитные NOD/Shi-scid IL2rgamma(ноль) (NOG) получали в день 0 (D0) клетки H929 множественной миеломы человека в виде подкожной (п/к) инъекции в правый дорсальный подвздох. В день 15 (D15) мыши NOG получали однократную внутрибрюшинную (в/б) инъекцию МКПК человека. Мышей затем тщательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля (n=9/группу) и проводили статистический тест для проверки однородности между группами. Экспериментальными группами были контрольная необработанная группа, обработанная контрольным TCV группа, обработанная 2,6 нМ/кг 83A10-TCVscv группа, и обработанная 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® (BCMA×CD3 (scFv)₂) группа. Лечение антителами, проводимое путем инъекции в хвостовую вену, начинали на 19-й день (D19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929. Схема лечения антителом TCV состояла из внутривенного введения один раз в неделю в течение 3 недель (то есть всего 3 инъекции антитела TCV). Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. ОО (мм³) в зависимости от дня после опухолевой инъекции. В день 19, первый день лечения, средний объем опухоли достигал 300±161 мм³ для контрольной группы, обработанной носителем (А), 315±148 мм³ для группы, обработанной 2,6 нМ/кг контрольного TCV (А), 293±135 мм³ для группы 2,6 нМ/кг 83A10-TCVscv (В) и 307±138 мм³ для группы 2,6 нМ/кг BCMA50-BiTE® (С). ОО каждой отдельной мыши для каждой экспериментальной группы наносили на график в зависимости от дня после опухолевой инъекции:

(А) контрольные группы, включающие контроль в виде носителя (цельная линия) и контрольного TCV (пунктирная линия),
 (В) группа 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг) и
 (С) BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг).

Черные стрелки показывают лечение TCV, проводимое путем внутривенной инъекцией. В группе 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг) у 6 из 9 мышей (67%) опухоль регрессировала даже ниже ОО, записанного в D19, то есть первое лечение TCV и регрессия опухоли сохранились до прекращения исследования. У 3 мышей в группе, обработанной 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг), которые не продемонстрировали регрессию опухоли, имели ОО, составляющие 376, 402 и 522 мм³ соответственно в D19. Напротив, ни у одной из 9 мышей (0%), получавших эквивалентную дозу BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг) по схеме один раз в неделю в течение 3 недель, не наблюдали регрессии опухоли в какой-либо момент времени (см. пример 17).

Фиг. 16. Процент роста опухоли (РО) рассчитывали для D19-D43 и сравнивали между группой 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг) и BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг). Процент роста опухоли, обозначенный как РО (%), определяли путем вычисления РО (%)=100×(медианное значение ОО анализируемой группы)/(медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель). По этическим причинам мышей умерщвляли, когда ОО достигал по меньшей мере 2000 мм³. РО (%) постепенно и значительно снижался в группе 83A10-TCVscv (2,6 нМ/кг), а также РО (%) всегда был ниже по сравнению с BCMA50-BiTE® (2,6 нМ/кг) (см. пример 17).

Фиг. 17. Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) 70 клонов, выбранных из ИФА. Все эксперименты проводились при 25°C с использованием PBST в качестве рабочего буфера (10 мМ ФСБ, pH 7,4 и 0,005 об./об.% Tween®20) с биосенсором ProteOn XPR36, снабженным сенсорными чипами GLC и GLM, и реагентами связывания. Иммуобилизации проводили при скорости 30 мкл/мин на чипе GLM. pAb (козы) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфическое Ab (Jackson) связывали в вертикальном направлении, используя стандартную процедуру аминного связывания: все шесть лигандных каналов активировали в течение

5 мин смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Сразу после активации поверхностей в течение 5 мин через все шесть каналов инъецировали рAb (козы) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичное антитело (50 мкг/мл, 10 мМ ацетата натрия, рН 5). Наконец, каналы блокировали 5-минутной инъекцией 1 М этаноламин-HCl (рН 8,5). Конечные уровни иммобилизации были похожими на всех каналах, в пределах от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab были захвачены из супернатантов *E. coli* путем одновременной инъекцией по пяти раздельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 мин, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль "в системе" в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека и яванского макака (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 мин. Кинетические данные были проанализированы в ProteOn Manager v. 2.1. Обработка данных реакции точки включала применение этапа межточкового сопоставления и шага двойного сопоставления с применением буферного контроля "в системе" (Myszka, 1999). Обработанные данные из повторных однократных инъекций соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Фиг. 18. Аффинность связывания антител к ВСМА на клетках НЕК-huBCMA, измеренная с помощью проточной цитометрии. Анти-ВСМА антитела использовали в качестве первого антитела, затем в качестве антитела обнаружения использовали вторичный меченый PE анти-человеческий Fc. Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значительно лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК.

Фиг. 19. Концентрации 42-ТСВсv измеряли в сыворотке и костном мозге после однократной в/в или п/к инъекции у яванских макаков. Животные получали однократную в/в или п/к инъекцию 42-ТСВсv, и образцы крови в определенный момент времени отбирали через периферическую вену для оценки ФК при предварительной дозе, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336 через 504 ч после дозирования. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученную сыворотку хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием. Полученный костный мозг хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценивание ФК данных. Стандартный не компартментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Диапазон эффективных концентраций 42-ТСВсv в аспиратах костного мозга пациентов с множественной миеломой составляет от 10 пМ до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ.

Фиг. 20. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами лейкозных клеток костного мозга пациента с плазмноклеточным лейкозом в присутствии аутологичных Т-лимфоцитов или инфильтрирующих Т-лимфоцитов костного мозга, индуцировался биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии. Определяли процент миеломных плазматических клеток с отрицательной реакцией на пропидий йодид и наносили на график процент жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга относительно контроля в виде питательной среды (МС) в зависимости от концентраций ТСВ. Наблюдали (А, В) зависимый от концентрации и специфичный лизис клеток плазмноклеточного лейкоза пациента, в то же время не наблюдали (Н) лизис микросреды костного мозга (ВММЕ) (данные не показаны). Не наблюдали индукцию клеточной гибели миеломных плазматических клеток с контрольным ТСВ при самой высокой концентрации тестируемых антител ТСВ. 42-ТСВсv было очень эффективным для индуцирования уничтожения клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга пациента, что отображалось в зависимом от концентрации снижении жизнеспособных (отрицательных по пропидий йодиду) миеломных плазматических клеток. Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или 0,1% (***). Фигура иллюстрирует результаты, полученные на образцах костного мозга пациента 1 (А) и пациента 2 (В) (см. также пример 20).

Фиг. 21. Перенаправленный лизис Т-лимфоцитами клеток H929 MM, индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами в комбинации с производными талидомида (леналидомид) или иммунотерапевтическими производными (анти-PD1 и анти-CD38 антителами), по данным проточной цитометрии. Клетки MM H929 совместно культивировали с лейкоцитами человека (n=1 или 5) и подвергали субоптимальным концентрациям биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела - только А) 83A10-ТСсv (10 пМ), или только В) 42-ТСВсv (10 пМ), в комбинации с субоптимальными концентрациями леналидомида (1 мкМ), анти-PD-1 (10 мкг/мл) и анти-CD38 даратумумаба (10 мкг/мл). Комбинирование биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела 83A10-ТСВсv (n=5) с леналидомидом или анти-CD38 даратумумабом значительно увеличивало их анти-MM эффективность в 4 и 2,5 раза соответственно (А). Комбинирование 42-ТСВсv (n=1) с леналидомидом или даратумумабом также увеличивало их анти-MM эффективность в уничтожении клеточных линий

ММ (В).

Подробное описание сущности изобретения

Как применяется в данном документе термин "BCMA, BCMA-мишень, BCMA человека" относится к В-клеточному антигену созревания человека, также известному как BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), который является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, которое преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках. Внеклеточный домен BCMA состоит в соответствии с UniProt из аминокислот 1-54 (или 5-51). Как применяется в данном документе, термин "антитело к BCMA, анти-BCMA антитело" относится к антителу, специфически связывающемуся с внеклеточным доменом BCMA.

"Специфическое связывание с BCMA или связывание с BCMA" относится к антителу, которое способно связываться с BCMA-мишенью с достаточной аффинностью, так что антитело является полезным в качестве терапевтического агента для нацеливания на BCMA. В некоторых вариантах осуществления степень связывания анти-BCMA антитела с белком, не родственным BCMA, примерно в 10 раз, предпочтительно больше чем в 100 раз меньше, чем связывание антитела с BCMA, как измерено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например Biacore®, иммуноферментного анализа (ИФА) или проточной цитометрии (FACS). В одном варианте осуществления антитело, которое связывается с BCMA, имеет константу диссоциации (КД) 10^{-8} М или меньше, предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-13} М, предпочтительно от 10^{-9} М до 10^{-13} М. В одном варианте осуществления анти-BCMA антитело связывается с эпитопом BCMA, который является консервативным среди BCMA разных видов, предпочтительно для человека и яванского макака, и, кроме того, предпочтительно также для BCMA мыши и крысы. "Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с CD3 и BCMA, биспецифическое антитело к CD3 и BCMA" относится к соответствующему определению связывания с обеими мишенями. Антитело, специфически связывающееся с BCMA (или BCMA и CD3), не связывается с другими человеческими антигенами. Поэтому в ИФА значения OD для таких несвязанных мишеней будут составлять или будут ниже значения предела обнаружения специфического анализа, предпочтительно $>0,3$ нг/мл, или составлять или будут ниже значений OD контрольных образцов без связанного с плашкой BCMA или с нетрансфицированными клетками НЕК293.

Предпочтительно анти-BCMA антитело специфически связывается с группой BCMA, состоящей из BCMA человека и BCMA не относящегося к человеку млекопитающего источника, предпочтительно BCMA из яванского макака, мыши и/или крысы. "Разница для яванского макака/человека" относится к соотношению аффинности КД BCMA яванского макака [М]/КД BCMA человека [М] (подробности см. в примере 3). "Разница по Mab CD3 для яванского макака/человека" в контексте данного документа относится к соотношению аффинности КД CD3 яванского макака [М]/КД CD3 человека [М]. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-BCMA/анти-CD3 антитело согласно данному изобретению демонстрирует разницу по Mab CD3 для яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Биспецифическое антитело согласно данному изобретению в одном варианте осуществления характеризуется тем, что оно также специфически связывается с CD3 яванского макака. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-BCMA/анти-CD3 антитело согласно данному изобретению демонстрирует разницу по Mab CD3 для яванского макака/человека от 1,25 до 5 или от 0,8 до 1,0. Предпочтительно разница для яванского макака/человека находится в одном и том же диапазоне для анти-BCMA и анти-CD3 антитела.

Как применяется в данном документе, термин "APRIL" относится к рекомбинантному укороченному APRIL мыши (аминокислоты 106-241; NP_076006).

APRIL может быть продуцирован, как описано в Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18).

Как применяется в данном документе, термин "BAFF" относится к рекомбинантному укороченному BAFF человека (UniProt Q9Y275 (TN13B_HUMAN), который может быть получен, как описано в Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Предпочтительно His-тэгируемый BAFF используется согласно данному изобретению. Предпочтительно His-тэгируемый BAFF продуцируют путем клонирования фрагмента ДНК, кодирующего остатки 82-285 BAFF, в вектор экспрессии, создавая гибрид с N-концевым His-тэгом, с сайтом расщепления тромбином, экспрессируя указанный вектор и расщепляя выделенный белок тромбином.

Анти-BCMA антитела анализируют с помощью ИФА на связывание с BCMA человека с использованием связанного с плашкой BCMA. Для данного анализа используют количество связанного с плашкой BCMA, составляющее предпочтительно 1,5 мкг/мл, и концентрацию(ии) в диапазоне от 0,1 до 200 нМ анти-BCMA антитела. Как применяется в данном документе, термин "NF-κB" относится к рекомбинантному NF-κB p50 (номер доступа P19838). Активность NF-κB может быть измерена с помощью ДНК-связывающего ИФА экстракта клеток NCI-H929 ММ (CRL-9068™). Клетки NCI-H929 ММ, необработанные или обработанные 0,1 мкг/мл ФНО-α, 1000 нг/мл термообработанного НТ-укороченного BAFF, 1000 нг/мл укороченного BAFF, от 0,1 пМ до 200 нМ контроля изотипа, и с или без 0,1 пМ до 200 нМ анти-BCMA антитела инкубируют в течение 20 мин. Активность NF-κB может быть проанализирована с использованием функционального ИФА, который обнаруживает хемилюминесцентный сигнал от p65, свя-

занного с консенсусной последовательностью NF-κB (US 6150090).

Как применяется в данном документе, термин "дополнительная мишень" предпочтительно означает CD3ε. Термин "первая мишень и вторая мишень" означает либо CD3 в качестве первой мишени и ВСМА в качестве второй мишени, либо означает ВСМА в качестве первой мишени и CD3 в качестве второй мишени. Как применяется в данном документе, термин "CD3ε или CD3" относится к CD3ε человека, описанному в UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин "антитело к CD3ε, антитело к CD3ε" относится к антителу, специфически связывающемуся с CD3ε. В одном варианте осуществления антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO: 1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответственно CDR1H, CDR2H и CDR3H тяжелой цепи, и переменный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO: 4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответственно CDR1L, CDR2L и CDR3L легкой цепи. В одном варианте осуществления антитело содержит переменные домены SEQ ID NO: 7 (VH) и SEQ ID NO: 8 (VL). Как применяется в данном документе, термин "анти-CD38 антитело" относится к антителу, специфически связывающемуся с CD38 человека. В варианте осуществления изобретения анти-CD38 антитело представляет собой даратумумаб (US20150246123). В варианте осуществления изобретения анти-CD38 антитело представляет собой изатаксимаб (SAR650984, US 8877899). В варианте осуществления изобретения анти-CD38 антитело представляет собой MOR202 (WO 2012041800). В варианте осуществления изобретения анти-CD38 антитело представляет собой Ab79 (US 8362211). В варианте осуществления изобретения анти-CD38 антитело представляет собой Ab19 (US 8362211). Дозирование такого анти-CD38 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, доза даратумумаба обычно составляет 16 мг/кг (www.ema.europa.eu).

Как применяется в данном документе, термин "соединение талидомида" или "талидомид и иммуно-терапевтическое производное" относится к 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диону и его иммунотерапевтическому производному. В варианте осуществления изобретения соединения талидомида выбирают из группы, состоящей из, но не ограниченной лишь этими: талидомида (регистрационный номер CAS 50-35-1), леналидомида (регистрационный номер CAS 191732-72-6), помалидомида (регистрационный номер CAS 19171-19-8), CC122 (регистрационный номер CAS 1398053-45-6) и CC-220 (регистрационный номер CAS 1323403-33-3) и их соответствующих солей (предпочтительно HCl-соли 1:1). Химическая формула CC-122 представляет собой 2,6-пиперидиндион, 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-3(4H-хиназолинил), гидрохлорид (1:1), и для CC-220-2,6-пиперидиндион, 3-[1,3-дигидро-4-[[4-(4-морфолинилметил)фенил]метокси]-1-оксо-2H-изоиндол-2-ил]-, (3S)-, гидрохлорид (1:1). Способы получения CC-220 описаны, например, в US 20110196150, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Дозирование талидомидных соединений выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, доза Revlimid® (леналидомид) обычно составляет 25 мг один раз в сутки перорально в дни 1-21 повторяющихся 28-суточных циклов (www.revlimid.com), а доза POMALYST® (помалидомид) для лечения множественной миеломы обычно составляет 4 мг в сутки, принимаемая перорально в дни 1-21 повторяющихся 28-дневных циклов (www.celgene.com). В одном варианте осуществления 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дион вводят в количестве от около 5 до около 50 мг в сутки.

В одном варианте осуществления CC-122 и CC-220 вводят в количестве от около 5 до около 25 мг в сутки. В другом варианте осуществления CC-122 и CC-220 вводят в количестве около 5, 10, 15, 25, 30 или 50 мг в сутки. В другом варианте осуществления в сутки вводят 10 или 25 мг CC-122 и CC-220. В одном варианте осуществления CC-122 и CC-220 вводят два раза в сутки.

Как применяется в данном документе, термин "анти-PD-1 антитело" относится к антителу, специфически связывающемуся с PD-1 человека. Такими антителами являются, например, описанные в WO 2015026634 (МК-3475, пембролизумаб), US 7521051, US 8008449 и US 8354509. Пембролизумаб (Keytruda®, МК-3475) также описан в WO 2009/114335, Poole, R.M. Drugs (2014) 74: 1973; Seiwert, T., et al., J. Clin. Oncol. 32,5s (suppl; abstr 6011). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-1 представляет собой МК-3475 (WHO Drug Information, Vol. 27, No. 2, pages 161-162 (2013)) и содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные на фиг. 6 WO 2015026634. Аминокислотная последовательность пембролизумаба описана в WO 2008156712 (CDRSEQ ID NO: 15, 16 и 17 легкой цепи и CDR SEQ ID NO: 18, 19 и 20 тяжелой цепи). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (BMS-936558, MDX 1106; WHO Drug Information, Vol. 27, No. 1, pages 68-69 (2013), WO 2006/121168, аминокислотные последовательности показаны в WO 2015026634). В варианте осуществления изобретения антитело PD-1 представляет собой пидилизумаб (CT-011, также известное как hBAT или hBAT-1; аминокислотную последовательность см. в WO 2003/099196; WO 2009/101611, Fried I. et al.; Neuro Oncol (2014) 16 (Suppl 5): v111-v112.). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой MEDI-0680 (AMP-514, WO 2010/027423, WO 2010/027827, WO 2010/027828, Hamid O. et al.; J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr TPS3087)). В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-1 представляет собой PDR001 (Naing A. et al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3060)). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-1 представляет собой REGN2810 (Papadopoulos KP et al.; J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3024)). В вари-

анте осуществления изобретения антитело к PD-1 представляет собой ламбролизумаб (WO2008/156712). В варианте осуществления изобретения антитело PD-1 представляет собой h409A11, h409A16 или h409A17, которые описаны в WO 2008/156712. Дозирование такого анти-PD-1 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, Keytruda® обычно вводят в концентрации 2 мг/кг массы тела раз в три недели (<http://ec.europa.eu/health/documents>).

Как применяется в данном документе, термин "анти-PD-L1 антитело" относится к антителу, специфически связывающемуся с PD-L1 человека. Такие антитела, например, описаны в WO 2015026634, WO 2013/019906, WO 2010/077634 и US 8383796. В варианте осуществления изобретения, антитело к PD-L1 представляет собой MPDL3280A (атезолизумаб, YW243.55.S70, WO 2010/077634, McDermott DF. Et al., JCO March 10, 2016 vol. 34 no. 8 833-842). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-L1 представляет собой MDX-1105. (BMS-936559, WO 2007/005874, Patrick A. Ott PA et al., DOI: 10.1158/1078-0432, Clinical Cancer Research-13-0143). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб, WO 2016/040238 Gilbert J. et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 2015(Suppl 2): P152). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-L1 представляет собой MSB001071 8C (авелумаб, Disis ML. et al., Journal of Clinical Oncology, Vol 33, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 5509). В варианте осуществления изобретения антитело к PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело, содержащее последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 17, как описано в WO 2016007235. Дозирование такого анти-PD-L1 антитела выполняется в соответствии с уровнем техники и описано в соответствующих инструкциях по применению. Например, атезолизумаб обычно вводят в концентрации 1200 мг в виде внутривенной инфузии в течение 60 мин раз в 3 недели (www.accessdata.fda.gov).

Как применяется в данном документе, термин "антитело" относится к моноклональному антителу. Антитело состоит из двух пар "легкая цепь" (LC) и "тяжелая цепь" (HC) (такие пары легкая цепь (LC)/тяжелая цепь в данном документе сокращенно обозначены как LC/HC). Легкие цепи и тяжелые цепи таких антител представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких доменов. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит константные домены тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3 (антитела класса IgA, IgD и IgG) и, необязательно, константный домен тяжелой цепи CH4 (антитела класса IgE и IgM). Каждая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи VL и константный домен легкой цепи CL. Переменные домены VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "Константные домены" тяжелой цепи и легкой цепи не участвуют непосредственно в связывании антитела с мишенью, но проявляют различные эффекторные функции. Как применяется в данном документе, термин "антитело" относится также к той части антитела, которая необходима, по меньшей мере, для специфического связывания с антигеном CD3, и соответствующим ВСМА. Следовательно, такое антитело (или часть антитела) может быть в одном варианте осуществления фрагментом Fab, если указанная часть антитела содержится в биспецифическом антителе согласно данному изобретению. Антитело согласно данному изобретению также может представлять собой Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv, или вовлекающий биспецифический активатор Т-лимфоцитов (BiTE).

Термин "антитело" включает в себя, например, мышинные антитела, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и сконструированные с помощью генной инженерии антитела (варианты или мутантные антитела) до тех пор, пока сохраняются их характерные свойства. Особенно предпочтительными являются человеческие или гуманизированные антитела, в частности в качестве рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител. Дополнительные варианты осуществления представляют собой гетероспецифичные антитела (биспецифические, триспецифичные и т.д.) и другие конъюгаты, например, с малыми цитотоксическими молекулами.

Термин "биспецифическое антитело", как применяется в данном документе, относится в одном варианте осуществления к антителу, в котором одна из двух пар тяжелой цепи и легкой цепи (HC/LC) специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с ВСМА. Термин также относится к другим формам биспецифических антител в соответствии с уровнем техники, в одном варианте осуществления к биспецифическим одноцепочечным антителам. Как применяется в данном документе, термин "ТСВ" относится к биспецифическому антителу, специфично связывающемуся с ВСМА и CD3. Как применяется в данном документе, термин "83A10-ТСВscv" относится к биспецифическому антителу, специфично связывающемуся с ВСМА и CD3, как определено его комбинацией тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 (2×) и SEQ ID NO: 48 и как показано на фиг. 2А и описано в EP 14179705. Как применяется в данном документе, термины "21-ТСВscv, 22-ТСВscv, 42-ТСВscv" относятся к соответствующим биспецифическим антителам: Mab21, как определено его комбинацией тяжелой и

легкой цепей SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 (2×), Mab 22, как определено его комбинациями тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (2×), и Mab42, как определено его комбинацией тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 48 из SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57-(2×).

Как применяется в данном документе, термин "не конъюгированное антитело" относится к антителу, которое специфично связывается с ВСМА, содержит часть Fc и не конъюгировано с терапевтическим агентом, например с цитотоксическим агентом или радиоактивной меткой. Как применяется в данном документе, термин "конъюгированное антитело, лекарственный конъюгат" относится к антителу, которое специфично связывается с ВСМА и конъюгировано с терапевтическим агентом, например с цитотоксическим агентом или радиоактивной меткой. Как применяется в данном документе, термин "биспецифическое одноцепочечное антитело" относится к единой полипептидной цепи, содержащей в одном варианте осуществления два связывающих домена, один из которых специфично связывается с ВСМА, а другой в одном варианте осуществления специфично связывается с CD3. Каждый связывающий домен содержит одну переменную область тяжелой цепи антитела ("область VH"), причем область VH первого связывающего домена специфично связывается с молекулой CD3, а область VH второго связывающего домена специфично связывается с ВСМА. Два связывающих домена необязательно соединены друг с другом коротким полипептидным спейсером. Неограничивающим примером полипептидного спейсера является Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) и его повторы. Каждый связывающий домен может дополнительно содержать одну переменную область из легкой цепи антитела ("область VL"), область VH и область VL в каждом первом и втором связывающих доменах, соединенных друг с другом через полипептидный линкер, достаточно длинный, чтобы сделать возможным спаривание области VH и области VL первого связывающего домена и области VH и области VL второго связывающего домена с друг с другом таким образом, что вместе они способны специфично связываться с соответствующими первым и вторым связывающими доменами (смотрите, например, EP 0623679). Также упоминаются биспецифические одноцепочечные антитела, например в Choi BD et al., *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Jul; 11(7):843-53 и Wolf E. et al., *Drug Discov Today.* 2005 Sep 15; 10(18): 1237-44.

Как применяется в данном документе, термин "диатело" относится к небольшому бивалентному и биспецифическому фрагменту антитела, содержащему переменный домен тяжелой (VH) цепи, соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL), соединенные пептидным линкером, который является слишком коротким, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами в той же цепи (Kirpryanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772). Это вызывает спаривание с комплементарными доменами другой цепи и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антигенсвязывающими сайтами. Чтобы сконструировать биспецифические диатела согласно данному изобретению, V-домены анти-CD3 антитела и анти-ВСМА антитела соединяют, чтобы создать две цепи VH(CD3)-VL(ВСМА), VH(ВСМА)-VL(CD3). Каждая цепь сама по себе не может связываться с соответствующим антигеном, но воссоздает функциональные сайты связывания антигена анти-CD3 антитела и анти-ВСМА антитела при спаривании с другой цепью. Две молекулы scFv с линкером между переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи, который является слишком коротким для внутримолекулярной димеризации, коэкспрессируются и самособираются для формирования биспецифических молекул с двумя сайтами связывания на противоположных концах. В качестве примера переменные области, кодирующие связывающие домены к ВСМА и CD3, соответственно, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР из конструкций ДНК, полученных, как описано, так что они могут быть клонированы в вектор, подобный pNOG, как описано в Kirpryanov et al., *J. Immunol, Methods*, 200, 69-77 (1997a). Две конструкции scFV затем объединяют в один вектор экспрессии в желаемой ориентации, в результате чего линкер VH-VL укорачивается, чтобы предотвратить обратное сворачивание цепей с самими собой. Сегменты ДНК разделены стоп-кодоном и сайтом связывания рибосомы (RBS). RBS делает возможным транскрипцию мРНК в виде бицистронной матричной РНК, которая транслируется рибосомами в два белка, которые нековалентно взаимодействуют с образованием молекулы диатела. Диатела, как и другие фрагменты антител, имеют преимущество в том, что они могут быть экспрессированы в бактериях (*E. coli*) и дрожжах (*Pichia pastoris*) в функциональной форме и с высоким выходом (вплоть до 1 г/л).

Как применяется в данном документе, термин "тандемные scFV" относится к одноцепочечной молекуле Fv (то есть к молекуле, образованной в результате объединения переменных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, VH и VL соответственно), как описано, например, в WO 03/025018 и WO 03/048209. Такие молекулы Fv, которые известны как TandAbs®, содержат четыре переменных домена антитела, причем:

- (i) либо первые два, либо последние два из четырех переменных доменов внутримолекулярно связываются друг с другом в одной и той же цепи, формируя антигенсвязывающий scFv в ориентации VH/VL или VL/VH,
- (ii) два других домена связываются межмолекулярно с соответствующими доменами VH или VL другой цепи с образованием антигенсвязывающих пар VH/VL.

В предпочтительном варианте осуществления, как упомянуто в WO 03/025018, мономеры такой молекулы Fv содержат по меньшей мере четыре переменных домена, из которых два соседних домена одного мономера образуют антигенсвязывающую единицу VH-VL или VL-VH scFv.

Как применяется в данном документе, термин "DARPin" относится к молекуле биспецифического анкиринового повтора, как описано, например, в US 2009082274. Такие молекулы получены из природных анкириновых белков, которые можно найти в геноме человека, и являются одним из наиболее распространенных типов связывающих белков. Модуль библиотеки DARPin определяется природными белковыми последовательностями анкириновых повторов, используя 229 анкириновых повторов для первоначального дизайна и еще 2200 для последующего уточнения. Модули служат строительными блоками для библиотек DARPin. Модули библиотеки напоминают последовательности генома человека. DARPin состоит из 4-6 модулей. Потому что каждый модуль примерно 3,5 кДа, размер среднего DARPin составляет 16-21 кДа. Выбор связывателей осуществляется с помощью рибосомного дисплея, который является полностью бесклеточным и описан в He M and Taussig MJ., *Biochem Soc Trans.* 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

Термин "вовлекающий биспецифический активатор Т-лимфоцитов" обозначает гибридные белки, состоящие из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) различных антител, или аминокислотных последовательностей из четырех разных генов в одной пептидной цепи длиной около 55 килодальтон. Один из scFv связывается с Т-лимфоцитами через рецептор CD3, а другой - с ВСМА.

Существует пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, обозначаемых греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ (Janeway CA, Jr et al. (2001). *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing). Тип присутствующей тяжелой цепи определяет класс антитела; эти цепи обнаружены в антителах IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). *Human Physiology*, 4th ed., Thomson Learning). Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и γ содержат примерно 450 аминокислот, тогда как μ и ϵ содержат примерно 550 аминокислот. Каждая тяжелая цепь имеет две области: константную область и переменную область. Константная область идентична у всех антител одного и того же изотипа, но отличается у антител разных изотипов. Тяжелые цепи γ , α и δ имеют константную область, состоящую из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (в ряд), и шарнирную область для дополнительной гибкости (Woof J, Burton D *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 89-99); тяжелые цепи μ и ϵ имеют константную область, состоящую из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway CA, Jr et al. (2001). *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing). Переменная область тяжелой цепи отличается у антител, продуцируемых разными В-лимфоцитами, но одинакова для всех антител, продуцируемых одним В-лимфоцитом или клоном В-лимфоцита. Переменная область каждой тяжелой цепи имеет длину примерно 110 аминокислот и состоит из одного домена антитела.

У млекопитающих есть только два типа легких цепей, которые называются лямбда (λ) и каппа (κ). Легкая цепь имеет два следующих друг за другом домена: один константный домен CL и один переменный домен VL. Примерная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. В одном варианте осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа (κ), и константный домен CL, в одном варианте осуществления, получают из легкой цепи каппа (K) (константный домен СК).

Как применяется в данном документе, термин "аминокислотная замена" относится к независимой аминокислотной замене в константном домене CH1 аминокислоты в позициях 147 и 213 на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и в константном домене CL аминокислота в позиции 124 замещена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). Дополнительно в одном варианте осуществления в константном домене CL аминокислота в позиции 123 независимо замещена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H). В одном варианте осуществления аминокислота 124 представляет собой K, аминокислота 147 представляет собой E, аминокислота 213 представляет собой E и аминокислота 123 представляет собой R. Аминокислотные замены находятся либо в CD3 Fab, либо в одном или двух ВСМА Fab. Биспецифические антитела к ВСМА и CD3 в качестве вариантов по заряду описаны в EP 14179705, раскрытом посредством ссылки (далее называемые "варианты по заряду, соответственно варианты по смене заряда"). Все нумерации аминокислот в данном документе соответствуют таким Кабата (Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). Как применяется в данном документе, термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" относятся к препарату молекул антитела одного аминокислотного состава.

"Антитела" согласно данному изобретению могут быть любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG или IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1), в результате чего оба антитела, из которых получено бивалентное биспецифическое антитело согласно данному изобретению, имеют часть Fc того же подкласса (например, IgG1, IgG4 и т.п., предпочтительно IgG1), предпочтительно одного и того же аллотипа (например, европейского).

"Часть Fc антитела" является термином, хорошо известным специалисту в данной области техники, и определяется исходя из расщепления антител папаином. В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит в качестве части Fc, в одном варианте осуществления часть Fc, полученную из человеческого источника, и предпочтительно все другие части человеческих константных

областей. Часть Fc антитела прямо участвует в активации комплемента, связывании C1q, активации C3 и связывании рецептора Fc. В то время как влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными сайтами связывания в части Fc. Такие сайты связывания известны в данной области техники и описаны, например, Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., и Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; и EP 0 307 434. Такими сайтами связывания являются, например, L234, L235, D270, N297, E318, KK320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии нумерации EU Кабата). Антитела подкласса IgG1, IgG2 и IgG3 обычно демонстрируют активацию комплемента, связывание C1q и активацию C3, тогда как IgG4 не активируют систему комплемента, не связывают C1q и не активируют C3. В одном варианте осуществления часть Fc представляет собой часть Fc человека. В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит вариант Fc Fc-области человеческого IgG дикого типа, причем указанный вариант Fc содержит аминокислотную замену в позиции Pro329 и по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU Кабата, и при этом указанное антитело проявляет уменьшенную аффинность к FcγRIIIA и/или FcγRIIA и/или FcγRI по сравнению с антителом, содержащим область Fc IgG дикого типа, и при этом АЗКЦ, индуцированная указанным антителом уменьшается по меньшей мере до 20% от АЗКЦ, индуцированной антителом, содержащим область Fc человеческого IgG дикого типа. В конкретном варианте осуществления Pro329 человеческой области Fc дикого типа в биспецифическом антителе замещен глицином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения пролиновой структуры типа "сэндвич" в интерфейсе Fc/Fcγ-рецептора, который образуется между пролином 329 Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 FcγRIII (Sondermann et al.: *Nature* 406, 267-273 (20 July 2000)). В дополнительном аспекте изобретения по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена в варианте Fc представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S, и, тем не менее, в другом варианте осуществления указанная по меньшей мере одна дополнительная аминокислотная замена представляет собой L234A и L235A области Fc IgG1 человека или S228P и L235E области Fc IgG4 человека. Такие варианты Fc подробно описаны в WO 2012130831. Как применяется в данном документе, под "эффекторной функцией" подразумевается биохимическое событие, которое возникает в результате взаимодействия области Fc антитела с рецептором Fc или лигандом. Эффекторные функции включают в себя, но не ограничиваются лишь этими АЗКЦ, АЗКФ (антителозависимый клеточный фагоцитоз) и КЗЦ (комплементзависимая цитотоксичность). Как применяется в данном документе, под "эффекторной клеткой" подразумевается клетка иммунной системы, которая экспрессирует один или большее количество рецепторов Fc и опосредует одну или большее количество эффекторных функций. Эффекторные клетки включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-лимфоциты, крупные гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, клетки естественные киллеры (NK) и γδ Т-лимфоциты, и могут быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Под "библиотекой" в данном документе подразумевается набор вариантов Fc в любой форме, включая в себя, но не ограничиваясь лишь этими, список нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, список нуклеотидных или аминокислотных замен в вариабельных позициях, физическую библиотеку, содержащую нуклеиновые кислоты, которые кодируют последовательности библиотеки, или физическую библиотеку, содержащую варианты белки Fc, в очищенной или неочищенной форме.

Как применяется в данном документе, термин "гамма-рецептор Fc" или "FcγR" означает любой член семейства белков, которые связываются с областью Fc антитела IgG и по существу кодируются генами FcγR. У людей это семейство включает в себя, но не ограничивается FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая изотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65), а также любые неизвестные изоформы или аллотипы FcγRs или FcγR человека. FcγR может быть из любого организма, включая в себя, но не ограничиваясь людьми, мышами, крысами, кроликами и обезьянами. Мышиные FcγRs включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), и FcγRIII-2 (CD16-2), а также любые неизвестные изоформы или аллотипы FcγR или FcγR мыши.

Как применяется в данном документе, термин "вариант Fc с усиленной эффекторной функцией" означает последовательность Fc, которая отличается от исходной последовательности Fc по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, или относится к другим модификациям, таким как изменение гликозилирования, например, по Asn279, которые усиливают эффекторные функции. Такими модификациями являются, например, упомянутые в Duncan et al., 1988, *Nature* 332:563-564; Lund et al., 1991, *J Immunol* 147:2657-2662; Lund et al., 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre et al., 1994, *Transplantation* 57:1537-

1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, //77muno/Lett 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200: 16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; US 5624821; US 5885573; US 6194551; WO 200042072; WO 199958572. Такие модификации Fc также включают в себя сконструированные в соответствии с изобретением гликоформы части Fc. Под "сконструированной гликоформой", как применяется в данном документе, подразумевается углеводная композиция, которую ковалентно присоединяют к полипептиду Fc, причем указанная углеводная композиция химически отличается от композиции исходного полипептида Fc. Сконструированные гликоформы могут быть получены любым способом, например, с использованием сконструированных или вариантных экспрессионных штаммов, путем коэкспрессии с одним или большим количеством ферментов, например D1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазой III (GnTIII), путем экспрессии полипептида Fc в различных организмах или клеточных линиях из различных организмов, или путем модификации углеводов после экспрессии полипептида Fc. Способы получения сконструированных гликоформ известны в данной области техники и упомянуты в Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473 US 6602684; WO 200061739; WO 200129246; WO 200231140; WO 200230954; технология Potelligent™ (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); технология разработки гликозилирования GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Цюрих, Швейцария)). Сконструированная гликоформа обычно относится к другой углеводной или олигосахаридной композиции, чем исходный полипептид Fc.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит вариант Fc с усиленной эффекторной функцией, проявляющий высокую аффинность связывания с Fc-гамма рецептором III (FcγRIII, CD 16a). Высокая аффинность связывания с FcγRIII означает, что связывание усилено для CD16a/F158 по меньшей мере в 10 раз по сравнению с исходным антителом (95% фукозилирование), в качестве стандарта экспрессируемого в клетках-хозяевах CHO, таких как клетки DG44 CHO или K1 CHO, или/и связывание усилено для CD16a/V158 по меньшей мере в 20 раз по сравнению с исходным антителом, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием иммобилизованного CD 16a при концентрации антитела 100 нМ. Связывание FcγRIII может быть усилено с помощью способов согласно уровню техники, например, путем модификации аминокислотной последовательности части Fc или гликозилирования части Fc антитела (смотрите, например, EP 2235061). Mori, K et al., Cytotechnology 55 (2007) 109 и Satoh M, et al., Expert Opin Biol Ther: 6 (2006) 1161-1173 относятся к линии CHO с нокаутированным геном FUT8 (α -1,6-фукозилтрансфераза) для продуцирования афукозилированных антител.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему вариabельную область, то есть связывающую область, из одного источника или вида и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или вида, обычно полученную методами рекомбинантной ДНК. Химерные антитела, содержащие мышиную вариabельную область и человеческую константную область, являются предпочтительными. Другими предпочтительными формами "химерных антител", охватываемых данным изобретением, являются те, в которых константная область была модифицирована или изменена по сравнению с таковой исходного антитела, для получения свойств согласно данному изобретению, особенно в отношении связывания C1q и/или связывания Fc рецептора (FcR). Такие химерные антитела также называют "антителами с измененным классом". Химерные антитела являются продуктом экспрессированных генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, кодирующие вариabельные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулинов. Способы получения химерных антител включают в себя обычные методы рекомбинантных ДНК и трансфекции генов, хорошо известные в данной области техники. См., например, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США № 5202238 и 5204244. Термин "гуманизованное антитело" относится к антителам, в которых каркас или "определяющие комплементарность области" (CDR) были модифицированы так, что содержат CDR иммуноглобулина отличающейся специфичности по сравнению с таковой исходного иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышиную CDR вставляют в каркасную область человеческого антитела для получения "гуманизованного антитела". См., например, Riechmann, L, et al., Nature 332 (1988) 323-327 и Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Другие формы "гуманизованных антител", охватываемые данным изобретением, представляют собой те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с формой исходного антитела для создания свойств согласно данному изобретению, в частности в отношении связывания C1q и/или связывания рецептора Fc (FcR).

Как применяется в данном документе, термин "человеческое антитело" включает в себя антитела, имеющие вариabельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела хорошо известны в данной области техники (van

Dijk, M.A., и van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела могут также продуцироваться в трансгенных животных (например, мышах), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар или выборку человеческих антител при отсутствии продуцирования эндогенных иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в такие зародышевые линии мутантных мышей приведет к продуцированию антител человека (смотрите, например, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Человеческие антитела также могут быть получены в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom, H.R., и Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Методы Cole et al. и Voerner et al. также доступны для приготовления человеческих моноклональных антител (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); и Voerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Как уже упоминалось для химерных и гуманизированных антител согласно данному изобретению, термин "человеческое антитело", как применяется в данном документе, также включает в себя такие антитела, которые модифицированы в константной области для получения свойств согласно данному изобретению, особенно в отношении связывания с C1q и/или связывания с FcR, например, путем "переключения классов", т. е. изменения или мутации частей Fc (например, из IgG1 в IgG4 и/или мутации IgG1/IgG4).

Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как применяется в данном документе, предназначен для включения в себя всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как клетка NSO или CHO, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека или антителах, экспрессируемых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области в перекомпонованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела подвергают соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хоть и получены из и связанные с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, в естественных условиях могут не существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Как применяется в данном документе, термин "переменная область" (переменная область легкой цепи (VL), переменная область тяжелой цепи (VH)) обозначает каждую из пар легкой и тяжелой цепей, которая непосредственно участвует в связывании антитела. Переменные домены легкой и тяжелой цепей человека имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных (FR) области, последовательности которых являются весьма консервативными, соединенные тремя "гиперпеременными областями" (или областями, определяющими комплементарность, CDR). Каркасные области принимают конформацию β -листа, и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру β -листа. CDR в каждой цепи удерживаются в их трехмерной структуре каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи образуют сайт связывания. Области CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антител и, следовательно, представляют собой дополнительный объект изобретения. "Связывающая часть, содержащая область VH и область VL", означает, что данные области являются соответствующими областями VH и VL указанной части, связывающей ВСМА или CD3.

Термины "гиперпеременная область" или "связывающая мишень часть антитела", когда применяются в данном документе, относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание мишени. Гиперпеременная область содержит аминокислотные остатки из "областей, определяющих комплементарность" или "CDR". "Каркасные" или "FR" области представляют собой такие области переменных доменов, которые не являются остатками гиперпеременной области, как определено в данном документе. Следовательно, легкая и тяжелая цепи антитела содержат от N- до C-конца домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на каждой цепи разделены такими каркасными аминокислотами. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляет собой область, которая в наибольшей степени способствует связыванию с мишенью. Области CDR и FR определяют в соответствии со стандартным обозначением Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Как применяется в данном документе, термины "CDR1H, CDR2H и CDR3H" относятся к соответствующим CDR тяжелой цепи, расположенным в переменном домене VH. Как применяется в данном документе, термины "CDR1L, CDR2L и CDR3L" относятся к соответствующим CDR легкой цепи, расположенным в переменном домене VL.

Константный домен тяжелой цепи CH1, которым заменяют домен тяжелой цепи CH3, может относиться к любому классу Ig (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Константный домен CL легкой цепи, которым заменяют домен CH3 тяжелой цепи, может быть типа лямбда (λ) или каппа (κ), предпочтительно типа каппа (κ).

Как применяется в данном документе, термин "мишень" или "молекула-мишень" используются взаимозаменяемо и относятся к ВСМА человека. В отношении биспецифических антител данный термин

относится к ВСМА и второй мишени. Предпочтительно в отношении биспецифических антител данный термин относится к ВСМА и CD3.

Термин "эпитоп" включает в себя любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления детерминанта эпитопа включает в себя химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорил или сульфонил, и, в некоторых вариантах, может иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область мишени, с которой связывается антитело. В целом, как правило, есть два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела. Что касается биспецифического антитела, то есть два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающиеся с первой мишенью, и еще два вектора, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь указанного антитела, специфически связывающиеся со второй мишенью. Один из двух векторов кодирует соответствующую легкую цепь, а другой из двух векторов кодирует соответствующую тяжелую цепь. Однако в альтернативном способе приготовления антитела только один первый вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающиеся с первой мишенью, и только один второй вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающиеся с второй мишенью, могут быть использованы для трансформации клетки-хозяина.

Предполагается, что термин "нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты", как применяется в данном документе, включает в себя молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК. Как применяется в данном документе, выражения "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают в себя потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают в себя первичную клетку изобретения и полученные из нее культуры без учета количества переносов. Также понятно, что все потомство может не быть полностью идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. Включены варианты потомства, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, для которой проводили скрининг в первоначально трансформированной клетке. Там, где подразумеваются разные обозначения, это будет ясно из контекста. Как применяется в данном документе, термин "трансформация" относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев используются клетки без труднопреодолимых барьеров в виде клеточной стенки, то, например, проводится трансфекция способом осаждения фосфатом кальция, как описано Graham and Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Однако также могут быть использованы другие способы введения ДНК в клетки, такие как инъекция в ядро или слияние протопластов. Если используются прокариотические клетки или клетки, которые содержат прочные конструкции в виде клеточной стенки, например, одним из способов трансфекции является обработка кальцием с использованием хлорида кальция, как описано Cohen SN, et al., *PNAS* 1972, 69 (8): 2110-2114.

Продуцирование рекомбинантных антител с использованием трансформации хорошо известно в данной области техники и описано, например, в обзорных статьях Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880 а также в US 6331415 и US 4816567. Как применяется в данном документе, термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого нуклеиновая кислота транскрибируется в мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК (также называемая транскриптом) впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды вместе называют генным продуктом.

Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия в эукариотической клетке может включать в себя сплайсинг мРНК.

"Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности, самореплицирующуюся, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в и/или между клетками-хозяевами. Термин включает в себя векторы, которые функционируют главным образом для встраивания ДНК или РНК в клетку (например, хромосомной интеграции), репликации векторов, которые функционируют, главным образом, для репликации ДНК или РНК, и векторов экспрессии, которые функционируют для транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также включены векторы, которые обеспечивают больше чем одну из описанных функций.

"Вектор экспрессии" представляет собой полинуклеотид, который при введении в подходящую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. "Система экспрессии" обычно относится к подходящей клетке-хозяину, состоящей из вектора экспрессии, который может функционировать, чтобы давать выход желаемого продукта экспрессии.

Антитела предпочтительно получают рекомбинантными способами. Такие способы широко известны в данной области техники и включают в себя экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяже-

лые цепи или их фрагменты, встраивают в векторы экспрессии с помощью стандартных способов. Экспрессия выполняется в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, таких как клетки CHO, клетки NSO, клетки SP2/0, клетки HEK293, клетки COS, дрожжи или клетки E.coli, и антитело выделяют из клеток (супернатанта или клеток после лизиса). Биспецифические антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Очистка выполняется для удаления других клеточных компонентов или других загрязнений, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков с помощью стандартных методов, включая щелочную/SDS обработку, колоночную хроматографию и другие, хорошо известные в данной области техники. Смотрите Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing и Wiley Interscience, New York (1987).

Экспрессия в клетках NSO описывается, например, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; и Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Временная экспрессия описывается, например, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Клонирование переменных доменов описывается Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289 и Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Предпочтительная система временной экспрессии (HEK293) описывается Schlaeger, E.-J. и Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 и Schlaeger, E.-J., в *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Например, контрольные последовательности, которые подходят для прокариот, включают в себя промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Антитела подходящим способом отделяют от культуральной среды с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК или РНК, кодирующая моноклональные антитела, легко выделяется и сиквенируется с использованием обычных процедур. Клетки гибридомы могут служить источником такой ДНК и РНК. После выделения, ДНК может быть встроена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки HEK293, клетки CHO или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы достичь синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты аминокислотной последовательности (или мутанты) антитела получают путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или путем нуклеотидного синтеза. Такие модификации могут быть выполнены, однако, только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не изменяют вышеупомянутые характеристики антител, такие как изотип IgG и связывание с мишенью, но могут улучшать выход рекомбинантного продукта, стабильность белка или облегчать очистку.

В одном варианте осуществления изобретения вместо биспецифического антитела используют химерный рецептор антигена (CAR), при этом CAR содержит антигенсвязывающий фрагмент, направленный против ВСМА, трансмембранный фрагмент и фрагмент активации Т-лимфоцитов, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой антитело согласно данному изобретению (в данном случае не биспецифическое антитело). Затем такой CAR обычно переносят с использованием вектора, предпочтительно ретровирусного вектора, содержащего последовательность, кодирующую указанный CAR, в иммунную эффекторную клетку, для которой в данном документе используется термин "CAR Т-лимфоцит". Такие CAR Т-лимфоциты затем используют в комбинации с указанным иммунотерапевтическим лекарственным средством.

Кодируемое антитело также может представлять собой его антиген-связывающий фрагмент, как указано. Структуры и создание таких "CAR ВСМА" описаны, например, в WO 2013154760, WO 2015052538, WO 2015090229 и WO 2015092024.

В одном варианте осуществления, вместо биспецифического антитела используется химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит, содержащий:

- (i) фрагмент распознавания В-клеточного антигена созревания (BCMA);
- (ii) спейсерный домен;
- (ii) трансмембранный домен и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен Т-лимфоцитов,

характеризующийся тем, что фрагмент распознавания ВСМА представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с ВСМА, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO: 17 и область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- a) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24;
- b) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26;
- c) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28;

d) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32;

e) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32 и

f) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32.

Фрагмент активации Т-лимфоцитов может представлять собой любой подходящий фрагмент, полученный или добытый из любой подходящей молекулы. В одном варианте осуществления, например, фрагмент активации Т-лимфоцитов содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен может представлять собой любой трансмембранный домен, полученный или добытый из любой молекулы, известной в данной области техники. Например, трансмембранный домен может быть получен или добыт из молекулы CD8a или молекулы CD28. CD8 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который служит корецептором рецептора Т-лимфоцита (TCR) и экспрессируется преимущественно на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Наиболее распространенная форма CD8 существует в виде димера, состоящего из альфа-цепи CD8 и бета-цепи CD8. CD28 экспрессируется на Т-лимфоцитах и обеспечивает костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-лимфоцитов. CD28 является рецептором для CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2). В предпочтительном варианте осуществления CD8 альфа и CD28 являются человеческими. В дополнение к трансмембранному домену фрагмент активации Т-лимфоцитов дополнительно содержит внутриклеточный (т.е. цитоплазматический) сигнальный домен Т-лимфоцитов. Межклеточный сигнальный домен Т-лимфоцита может быть получен или добыт из молекулы CD28, молекулы дзета CD3 или ее модифицированных вариантов, гамма-цепи человеческого Fc-рецептора (FcR γ), молекулы CD27, молекулы OX40, молекулы 4-1BB, или других внутриклеточных сигнальных молекул, известных в данной области техники. Как обсуждалось выше, CD28 является маркером Т-лимфоцитов, важным для костимуляции Т-лимфоцитов. Дзета CD3 объединяется с TCR для продуцирования сигнала и содержит иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина (ITAM). 4-1BB, также известный как CD137, передает мощный костимулирующий сигнал Т-лимфоцитам, способствуя дифференциации и увеличивая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. В одном варианте осуществления CD28, дзета CD3, 4-1BB, OX40 и CD27 являются человеческими.

Такой CAR или соответствующий CAR Т-лимфоцитов существует совместно с иммунотерапевтическим лекарственным средством, описанным в данном документе, для применения:

- a) в комбинированном применении в лечении множественной миеломы согласно изобретению;
- b) в способе лечения множественной миеломы согласно изобретению;
- c) в терапевтической комбинации для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, согласно изобретению;
- d) в наборе согласно изобретению и
- e) в способе изготовления лекарственного средства согласно изобретению.

Биспецифические связыватели Т-лимфоцитов (TCB) обладают очень высокой, зависимой от концентрации/заполненности рецепторов опухолевых клеток активностью в отношении уничтожения клеток (например EC₅₀ при *in vitro* уничтожении клеток определяется в суб- или более низком пиколярном диапазоне; Dreier et al., *Int J Cancer* 2002), биспецифические связыватели Т-лимфоцитов (TCB) предоставляют в значительно более низких дозах чем обычные моноспецифические антитела. Например, блинатумомаб (CD19 \times CD3) вводят непрерывной внутривенной дозой от 5 до 15 мкг/м²/сутки (т.е. только от 0,35 до 0,105 мг/м²/неделя) для лечения острого лимфолейкоза, или 60 мкг/м²/сутки для лечения неходжкинской лимфомы, и сывороточные концентрации при таких дозах находятся в диапазоне от 0,5 до 4 нг/мл (Klinger et al., *Blood* 2012; Torp et al., *J Clin Oncol* 2011; Goebeler et al., *Ann Oncol* 2011). Поскольку низкие дозы TCB могут проявлять высокую эффективность у пациентов, предусматривается, что в клинических условиях подкожное введение для биспецифического антитела и лекарственного средства является возможным и предпочтительным (предпочтительно в диапазоне доз от 0,1 до 2,5, предпочтительно 25 мг/м²/неделя, предпочтительно 250 мг/м²/неделя). Даже при таких низких концентрациях/дозах/заполненности рецепторов TCB может вызывать значительные побочные эффекты (Klinger et al., *Blood* 2012). Поэтому очень важно контролировать заполненность/охват опухолевых клеток. У пациентов с высокими и изменчивыми уровнями сывороточных APRIL и BAFF (например, у пациентов с множественной миеломой, Moreaux et al., 2004; *Blood* 103(8): 3148-3157) количество TCB, связанного с опухолевыми клетками, что соответствует заполненности опухолевых клеток, может значительно зависеть от APRIL/BAFF. Но при использовании указанного антитела, применяемого в данном изобретении, заполненность опухолевых клеток относительно эффективности/безопасности может не потребоваться увеличение дозы для антитела согласно данному изобретению, поскольку на указанное антитело может не влиять конкуренция с лигандами APRIL/BAFF. Другое преимущество биспецифического антитела основано на включении части Fc, которая увеличивает период полужизни до около 4-12 дней и делает возможным введения по меньшей мере один или два раза в неделю, по сравнению с TCB без части Fc (например, блинатумомаб), которые необходимо выполнять внутривенно и непрерывно с помощью насо-

са, носимого пациентами.

Биологические свойства биспецифических антител были исследованы в нескольких исследованиях в сравнении с 83A10-ТСВсв. Эффективность индуцирования перенаправленной цитотоксичности Т-лимфоцитов, например анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами 21-ТСВсв, 22-ТСВсв, 42-ТСВсв по сравнению с 83A10-ТСВсв оценивали на клеточной линии H929 ММ (пример 8, табл. 12, фиг. 4). Были исследованы антитела, использованные в данном изобретении, и анализ показал, что значения EC_{50} , выражающие зависимость от концентрации уничтожение клеток H929, были выше чем значения EC_{50} , определенные для 83A10-ТСВсв; это предполагает, что биспецифические антитела были менее эффективными в индукции уничтожения клеток H929 ММ, чем Mab 83A10 в качестве ТСВ. Удивительно, но наблюдалась обратная ситуация, когда перенаправленную цитотоксичность Т-лимфоцитов определяли на клеточной линии RPMI-8226 ММ, а также на клеточной линии JN-3 (соответственно, примеры 10 и 11, табл. 13, 14 и 15, фиг. 6 и 7): биспецифические антитела показали более низкое EC_{50} и, следовательно, более высокую активность, чем 83A10-ТСВсв. К удивлению изобретателей, биспецифические антитела показали несколько преимуществ в прямом сравнении с 83A10 ТСВсв в аспиратах костного мозга, свежееотобранных у пациентов с ММ (примечание: чтобы получить наилучшее возможное сравнение, во всех аспиратах костного мозга всегда все биспецифические Т-лимфоцитарные (ТСВ) антитела тестировали в одинаковых концентрациях);

Более высокая эффективность уничтожения миеломных клеток, то есть тот же % уничтожения уже при более низких концентрациях, чем с 83A10-ТСВсв, соответственно, кривые зависимости концентрации для уничтожения смещены влево (пример 13, табл. 18, 19 и 20, фиг. 8, 9 и 10). Снижение составляло от 77,1 до 100% уже при концентрации 1 нМ биспецифических антител в аспиратах костного мозга семи разных пациентов, по сравнению с контролем в виде отрицательных по пропидий йодиду жизнеспособных раковых клеток множественной миеломы. При использовании 1 нМ 83A10-ТСВсв в тех же семи аспиратах костного мозга было достигнуто снижение только на 37,1-98,3% (табл. 20 и 21).

Более высокое максимальное уничтожение по сравнению с 83A10-ТСВсв было достигнуто при самой высокой протестированной концентрации (10 нМ) в том же эксперименте с семью (7) аспиратами костного мозга для биспецифических антител (табл. 20 и 21).

Не отвечающие на действие 83A10-ТСВсв могут быть обращены в отвечающие, если применяют 22-ТСВсв/42-ТСВсв: в образцах костного мозга двух (2) пациентов, у которых не наблюдали уничтожение в ответ на 83A10-ТСВсв, неожиданно было обнаружено уничтожение с антителами в виде ТСВ согласно изобретению (фиг. 9А и 9В).

ТСВ ВСМА×CD3, используемый в данном изобретении, связывается с ВСМА человека и яванских макак, а также с ВСМА мышей и крыс, является подходящим для токсикологического исследования на яванских макаках, если связыватель CD3 также связывается с CD3 яванского макака, или на мышах/крысах, если связыватель CD3 также связывается с ВСМА мыши/крысы. Удивительно, но аффинность связывания с ВСМА яванского макака очень близка к аффинности связывания с ВСМА человека. SPR применяли для измерения аффинности связывания с ВСМА человека и яванского макака (пример 2, табл. 4). Различие яванский макак/человек (соотношение аффинности для яванского макака к таковой человека для ВСМА, КД) рассчитывали по данным измеренной аффинности путем деления аффинности к ВСМА яванского макака на аффинность к ВСМА человека (пример 3, табл. 5). Для 83A10 было обнаружено различие яванский макак/человек, составляющее 15,3 (то есть в 15,3 раза более низкая аффинность связывания с ВСМА яванского макака, чем с таковым человека). К удивлению изобретателей биспецифические антитела показали различие яванский макак/человек между 15,4 и 1,7, что является сходным или в большинстве случаев более предпочтительным различием яванский макак/человек, чем таковое у 83A10 (табл. 5). Поскольку связыватель CD3, используемый в ТСВ ВСМА×CD3, является перекрестно-реактивным с CD3 яванского макака, исследования фармакокинетики и фармакодинамики могут быть получены на яванских макаках (см. пример 16). Также токсикологические исследования на яванских макаках позволяют прогнозировать фармакологические и токсикологические эффекты у людей, а особенность в виде перекрестной реактивности с яванскими макаками является преимуществом для пациентов. Антитела к ВСМА, используемые в данном изобретении, также связываются с мышинным ВСМА (например, Кот клонов 22 и 42, измеренная с помощью SPR - 0,9 и 2,5 нМ), см. табл. 2D в примере 1.1.1A.4). Связыватель CD3 ТСВ ВСМА×CD3 не является перекрестно-реактивным по отношению к CD3 мыши.

Таким образом, преимущества по эффективности и активности в уничтожении линий клеток ММ с низкой экспрессией ВСМА, таких как RPMI-8226 и JN-3, и особенно в уничтожении клеток ММ в аспиратах костного мозга пациентов, и, кроме того, очень подходящее различие яванский макак/человек в аффинности связывания с ВСМА, делают антитела, используемые в данном изобретении, и соответствующие ТСВ по существу перспективными агентами для лечения пациентов с ММ. Кроме того, анти-ВСМА×CD3 ТСВсв, используемый в данном изобретении, имеет как и 83A10-ТСВсв, подходящие свойства, такие как длительный период полужизни, эффективность при введении один раз в неделю (внутривенно, подкожно), низкую или отсутствующую тенденцию к агрегации, и может быть изготовлен с высо-

кой чистотой и хорошим выходом.

Таблица 1А. Последовательности антител

SEQ ID NO:	Название(ния)	аминокислотные последовательности
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWW
7	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWWRQAPGKGLEWWSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLGGAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGKTLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWWRQAPGKGLEWWSAISGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWWRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYL AWYQQKPGQAPRLLIEHASTRATGIPDRFSGSG SGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYL

042851

		AWYQQKPGQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSDEYL SWYQQKPGQAPRLIHSASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFG QGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFDY
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSYLAW
19	83A10 CDR2L	YGASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPDFTF
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYLAW
26	Mab22 CDR2L	SGAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLSW
28	Mab42 CDR2L	HSASTRAT

042851

29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPDFD
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAP MGWVRQAPGKGLEWWSAISYIGHTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLG WFDYWGQGLTVTVSS
39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNA MGWVRQAPGKGLEWWSAINRFGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISPTGFSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSS
41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPK SC

	CH1	
42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
45	83A10 HC c «ВЫСТУПОМ»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWWSAISGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQ VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ AVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

46	83A10 HC с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWWRQAPGKGLEWWSAISGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLV CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFG QGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWWRQAPGKGLEWWSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
49	Mab21 HC с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWWRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG

		<p>VHTFPAVLQSSGLYLSVWVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQ AVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYLSVWVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYDGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
50	Mab21 HC с «отверстием»	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWWRQAPGKGLEWWSAISGPSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYLSVWVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSL SAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKLSLSPGK</p>
51	Mab21 LC	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYL AWYQQKPGQAPRLIEHASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFG QGTEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVV</p>

		CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
52	Маб22 НС с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGGGGGGSSQ AVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYA NWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGAALTLGAQPEDEAEYCALWYSNLWVWF GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKAGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
53	Маб22 НС с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNA MGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV LGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI

		EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	Mab42 HC с «выступом»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDNMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPSTLVSPGGTVLTCGSSTGAVTTSNYANWWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDNLGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	Mab42 HC с «отверстием»	EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDNMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDNLGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

Таблица 1В. Последовательности антител (короткий перечень)

антитело к CD3	SEQ ID NO:							
	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
	7	8	1	2	3	4	5	6
антитело к ВСМА	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33

Таблица 2А. Дополнительные конструкции

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

Таблица 2В. Дополнительные конструкции

Конструкция	SEQ ID NO:			
	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
ВСМА VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc «выступ» LALA PG (HC с «выступом»)	45	49	52	55
ВСМАcv HC «отверстие» LALA PG (HC с «отверстием»)	46	50	53	56
ВСМАcv чел. IgG1 LC (ВСМА LC)	47	51	54	57
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

Чтобы получить следующие (2+1) Fc-содержащие анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ, использовали соответствующие конструкции/идентификаторы последовательностей, как указано в табл. 2В выше: 83A10-ТСВcv: 45, 46, 47 (×2), 48 (фиг. 2А); 21-ТСВcv: 48, 49, 50, 51 (×2) (фиг. 2А); 22-ТСВcv: 48, 52, 53, 54 (×2) (фиг. 2А); 42-ТСВcv: 48, 55, 56, 57 (×2) (фиг. 2А).

В дополнительных конкретных вариантах осуществления изобретения перечислены:

I. Биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (ВСМА), и вторую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), и иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела, для комбинированного применения в лечении множественной миеломы, характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24;
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

II. Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство для комбинированного применения в лечении множественной миеломы согласно варианту осуществления I, характеризующееся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

III. Способ лечения множественной миеломы, характеризующийся введением пациенту, нуждающемуся в таком лечении:

а) биспецифического антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (ВСМА), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3); и

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержа-

щую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

IV. Способ согласно варианту осуществления III, характеризующийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаб, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17 и атезолизумаба.

V. Терапевтическая комбинация для достижения лизиса клетки множественной миеломы у пациента, страдающего множественной миеломой, характеризующаяся тем, что содержит:

a) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3); и

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

что характеризуется тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

VI. Терапевтическая комбинация согласно варианту осуществления V, характеризующаяся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

VII. Набор, характеризующийся тем, что содержит:

a) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связывающая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28 в фармацевтически приемлемом носителе;

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела;

c) фармацевтически приемлемый носитель и инструкции для введения указанного биспецифического антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

VIII. Набор согласно варианту осуществления VII, характеризующийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

IX. Способ изготовления лекарственного средства, характеризующийся тем, что используют:

a) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), характеризующееся тем, что указанная первая связываю-

шая часть содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- i) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- ii) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- iii) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28;

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида и его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела;

c) объединяя указанное биспецифическое антитело и указанное иммунотерапевтическое лекарственное средство в фармацевтически приемлемом носителе.

Биспецифическое антитело и иммунотерапевтическое лекарственное средство применяют в терапевтически эффективном количестве.

X. Способ изготовления лекарственного средства согласно варианту осуществления IX, характеризующийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из даратумумаба, изатаксимаба, MOR202, Ab79, Ab19, талидомида, леналидомида, помалидомида, CC-122, CC-220, пембролизумаба, пидилизумаба, ниволумаба, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, ламбролизумаба, MDX-1106, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и MDX-1105.

Ниже перечислены конкретные варианты осуществления первой связывающей части согласно изобретению:

1. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO: 17 и область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- a) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- b) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26,
- c) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28,
- d) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32,
- e) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32 и
- f) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32.

2. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- a) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- b) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- c) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

3. Антитело согласно варианту осуществления 1 или 2, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VL область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14.

4. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12.

5. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 13.

6. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 14.

7. Антитело согласно варианту осуществления 1 или 2, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).

8. Антитело согласно варианту осуществления 7, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

9. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с BCMA, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 31, область CDR2L SEQ ID NO: 32 и область CDR3L SEQ ID NO: 20, и комбинацию

областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30,
- б) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35 или
- в) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37.

10. Антитело согласно варианту осуществления 9, характеризующееся тем, что содержит область VL SEQ ID NO: 12 и область VH, выбранную из группы, содержащую области VH SEQ ID NO: 38, 39 и 40.

11. Антитело согласно варианту осуществления 9 или 10, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).

12. Антитело согласно варианту осуществления 9 или 10, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

13. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-12, характеризующееся тем, что оно также специфически связывается с ВСМА яванского макака и содержит дополнительный фрагмент Fab, специфически связывающийся с CD3ε.

14. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-13, характеризующееся тем, что оно является антителом с частью Fc или без части Fc. Ниже перечислены конкретные варианты осуществления биспецифического антитела согласно изобретению.

15. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с ВСМА и CD3ε, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO: 17 и область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- б) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26,
- в) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28,
- г) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32,
- д) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32 и
- е) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37, область CDR1L SEQ ID NO: 31, и область CDR2L SEQ ID NO: 32.

16. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека (далее также называемый "ВСМА") и CD3ε человека (далее также называемый "CD3"), характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- б) область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26 или
- в) область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28.

17. Биспецифическое антитело согласно варианту осуществления 15 или 16, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH область VH SEQ ID NO: 10.

18. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-16, характеризующееся тем, что VL ВСМА выбирают из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 12, 13 и 14.

19. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 14-18, характеризующееся тем, что содержит в качестве области VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 12, или в качестве VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10 и в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 13, или в качестве VH ВСМА область VH SEQ ID NO: 10, а в качестве области VL область VL SEQ ID NO: 14.

20. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15 или 19, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).

21. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-20, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

22. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с ВСМА и CD3, характеризующееся тем, что содержит область VH, содержащую область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 31, область CDR2L SEQ ID NO: 32 и область CDR3L SEQ ID NO: 20, и комбинацию областей CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30,

b) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35 или

c) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37.

23. Биспецифическое антитело согласно варианту осуществления 22, характеризующееся тем, что содержит область VL SEQ ID NO: 12 и область VH, выбранную из группы, включающую в себя области VH SEQ ID NO: 38, 39 и 40.

24. Биспецифическое антитело согласно варианту осуществления 22 или 23, характеризующееся тем, что аминокислоту 49 области VL выбирают из группы аминокислот: тирозин (Y), глутаминовая кислота (E), серин (S) и гистидин (H).

25. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 22-24, характеризующееся тем, что аминокислота 74 области VL представляет собой треонин (T) или аланин (A).

26. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-25, характеризующееся тем, что содержит анти-BCMA антитело согласно изобретению и анти-CD3 антитело, в котором:

a) легкая цепь и тяжелая цепь антитела согласно любому варианту осуществления 1-7 и

b) легкая цепь и тяжелая цепь антитела специфически связываются с CD3, при этом переменные домены VL и VH или константные домены CL и CH1 заменяют друг другом.

27. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-26, характеризующееся тем, что содержит не большее чем один фрагмент Fab части анти-CD3 антитела, не больше чем два фрагмента Fab части анти-BCMA антитела и не больше чем одну часть Fc.

28. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-27, характеризующееся тем, что содержит часть Fc, соединенную ее N-концом с C-концом указанного фрагмента Fab антитела к CD3 и с C-концом одного из указанных фрагментов Fab антитела к BCMA.

29. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-28, характеризующееся тем, что содержит второй фрагмент Fab указанного анти-BCMA антитела (часть антитела к BCMA), соединенный его C-концом с N-концом указанного фрагмента Fab указанного анти-CD3 антитела (часть антитела к CD3) указанного биспецифического антитела.

30. Биспецифическое антитело согласно варианту осуществления 29, характеризующееся тем, что домен VL указанного фрагмента Fab анти-CD3 антитела соединен с доменом CH1 указанного второго фрагмента Fab анти-BCMA антитела.

31. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-30, характеризующееся тем, что переменный домен VH части анти-CD3 антитела (далее называемый "VH CD3") содержит CDR SEQ ID NO: 1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменный домен VL части анти-CD3 антитела (далее называемый "VL CD3"), содержит CDR SEQ ID NO: 4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответствующих CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

32. Биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления 15-31, характеризующееся тем, что переменные домены части анти-CD3ε антитела представляют собой SEQ ID NO: 7 и 8.

33. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен BCMA человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит:

a) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела по любому из пп.1-7 и

b) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг другом; и

c) при этом в константном домене CL первой легкой цепи a) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 первой тяжелой цепи a) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (см., например, фиг. 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

34. Биспецифическое антитело конкретно по п.33, характеризующееся тем, что в дополнение содержит фрагмент Fab указанного первого антитела (далее называемый также "BCMA-Fab") и в константном домене CL указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 124 замещают независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 указанного BCMA-Fab аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 замещают независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата) (см., например, фиг. 2A, 2C).

35. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен BCMA человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит:

a) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела по любому из пп.1-7 и

b) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с CD3, и при этом переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго

го антитела заменены друг другом; и при этом

с) в константном домене CL второй легкой цепи а) аминокислоту в позиции 124 независимо замещают лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация Кабата), и при этом в константном домене CH1 второй тяжелой цепи б) аминокислоту в позиции 147 и аминокислоту в позиции 213 независимо замещают глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация Кабата).

36. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с двумя мишенями, которые представляют собой внеклеточный домен ВСМА человека и CD3ε человека, характеризующееся тем, что содержит набор тяжелых и легких цепей, выбранный из группы, состоящей из полипептидов:

- i) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 (2×); (набор 1 TCB антитела 21);
- ii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (2×) (набор 2 TCB антитела 22) и
- iii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, и SEQ ID NO: 57 (2×) (набор 3 TCB антитела 42).

37. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит, содержащий фрагмент распознавания антигена, направленный против ВСМА и фрагмента активации Т-лимфоцитов, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело или фрагмент антитела согласно любому из вариантов осуществления 1-14.

38. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит согласно варианту осуществления 37, характеризующийся тем, что содержит:

- (i) фрагмент распознавания В-клеточного антигена созревания (BCMA);
- (ii) спейсерный домен;
- (ii) трансмембранный домен и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен Т-лимфоцитов.

39. Химерный рецептор антигена (CAR) или соответствующий CAR Т-лимфоцит согласно варианту осуществления 37 или 38, характеризующийся тем, что фрагмент распознавания антигена представляет собой моноклональное антитело или фрагмент антитела, специфически связывающийся с ВСМА, характеризующееся тем, что содержит область CDR3H SEQ ID NO: 17 и область CDR3L SEQ ID NO: 20 и комбинацию областей CDR1H, CDR2H, CDR1L и CDR2L, выбранную из группы:

- а) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 23 и область CDR2L SEQ ID NO: 24,
- б) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 25 и область CDR2L SEQ ID NO: 26,
- с) область CDR1H SEQ ID NO: 21 и область CDR2H SEQ ID NO: 22, область CDR1L SEQ ID NO: 27 и область CDR2L SEQ ID NO: 28,
- д) область CDR1H SEQ ID NO: 29 и область CDR2H SEQ ID NO: 30, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32,
- е) область CDR1H SEQ ID NO: 34 и область CDR2H SEQ ID NO: 35, область CDR1L SEQ ID NO: 31 и область CDR2L SEQ ID NO: 32 и
- ф) область CDR1H SEQ ID NO: 36 и область CDR2H SEQ ID NO: 37, область CDR1L SEQ ID NO: 31, и область CDR2L SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления связывание биспецифического антитела не снижается 100 нг/мл APRIL больше чем на 20%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 405 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим ВСМА без APRIL, указанное антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только APRIL, и указанное антитело не изменяет активацию NF-κB без APRIL больше чем на 20% по сравнению с случаем без указанного антитела.

В одном варианте осуществления связывание биспецифического антитела в концентрации 6,25 нМ не снижается 140 нг/мл APRIL больше чем на 10%, предпочтительно не снижается больше чем на 1%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 450 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим ВСМА без APRIL. Связывание указанного антитела в концентрации 50 нМ не снижается 140 нг/мл APRIL мыши больше чем на 10%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 450 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим ВСМА без APRIL.

В одном варианте осуществления связывание указанного антитела не снижается 100 нг/мл APRIL и не снижается 100 нг/мл BAFF больше чем на 20%, как измерено в анализе ИФА в виде OD при 405 нм, по сравнению с связыванием указанного антитела с человеческим ВСМА без APRIL или BAFF соответственно, антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению с только APRIL, не изменяет BAFF-зависимую активацию NF-κB больше чем на 20% по сравнению только с BAFF, и не изменяет активацию NF-κB без BAFF и APRIL больше чем на 20% по сравнению с случаем без указанного антитела. В одном варианте осуществления связывание указанного антитела с ВСМА человека не снижается 100 нг/мл APRIL больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА, не снижается 1000 нг/мл APRIL больше чем на 20%, как измерено в указанном ИФА, и не снижается 1000 нг/мл APRIL больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА.

В одном варианте осуществления связывание указанного антитела с ВСМА человека не снижается 100 нг/мл APRIL и не снижается 100 нг/мл BAFF больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА, не снижается 1000 нг/мл APRIL и не снижается 1000 нг/мл BAFF больше чем на 20%, как измерено в указанном ИФА, не снижается 1000 нг/мл APRIL и не снижается 1000 нг/мл BAFF больше чем на 15%, как измерено в указанном ИФА.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело не изменяет APRIL-зависимую активацию NF-κB больше чем на 15%, не изменяет BAFF-зависимую активацию NF-κB больше чем на 15% и не изменяет NF-κB активацию без APRIL и BAFF больше чем на 15%.

В одном варианте осуществления связывание антитела с ВСМА не снижается APRIL, не снижается BAFF больше чем на 25%, больше чем на 20% и больше чем на 10%, как измерено по связыванию указанного антитела в концентрации 5 нМ, предпочтительно 50 и 140 нМ, с клетками NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) в присутствии или в отсутствие APRIL или соответственно BAFF в концентрации 2,5 мкг/мл по сравнению со связыванием указанного антитела с клетками NCI-H929 в отсутствие APRIL или BAFF соответственно.

В одном варианте осуществления нижеследующие примеры, перечень последовательностей и фигуры предоставлены для того, чтобы помочь понять данное изобретение, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Понятно то, что могут быть внесены модификации в изложенные процедуры без отклонения от сущности изобретения.

Материалы и общие способы Способы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК применяли стандартные способы, как описано в Sambrook, J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-биологические реагенты использовали в соответствии с инструкциями производителя. Общая информация о нуклеотидных последовательностях легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов человека приведена в Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242. Аминокислоты цепей антител были пронумерованы и обозначены согласно Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Синтез генов

а) Желаемые генные сегменты получали из олигонуклеотидов, произведенных химическим синтезом. Генные сегменты длиной 600-1800 п.н., которые были фланкированы единичными сайтами расщепления эндонуклеазами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая амплификацию ПЦР, и затем клонировали с помощью указанных сайтов рестрикции, например, KpnI/Sad или AscI/PacI в клонирующий вектор pGA4 на основе pPCRScript (Stratagene). Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали сиквенированием ДНК. Синтезированные генные фрагменты были упорядочены в соответствии с предоставленными инструкциями Geneart (Регенсбург, Германия).

б) желаемые генные сегменты, когда это было необходимо, либо создавались с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо были синтезированы Geneart AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и продуктов ПЦР с помощью автоматического синтеза генов. Генные сегменты, фланкированные единичными сайтами расщепления эндонуклеазой рестрикции, были клонированы в стандартные векторы экспрессии или в векторы для сиквенирования, для дополнительного анализа. Плазмидную ДНК очищали от трансформированных бактерий с использованием коммерчески доступных наборов для очистки плазмид. Концентрацию плазмид определяли с помощью УФ-спектропии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов гена была подтверждена сиквенированием ДНК. Генные сегменты конструировали с подходящими сайтами рестрикции, чтобы сделать возможным субклонирование в соответствующие векторы экспрессии. При необходимости, гены, кодирующие белки, конструировали с использованием 5'-концевой последовательности ДНК, кодирующей лидерный пептид, способствующий секреции белков в эукариотических клетках.

Определение последовательности ДНК

Последовательности ДНК определяли путем двухцепочечного сиквенирования.

Анализ последовательности ДНК и белка и обращение с данными последовательностей

Пакет программного обеспечения Clone Manager (Scientific & Educational Software) версии 9.2 использовался для картирования последовательности, анализа, аннотирования и иллюстрации.

Векторы экспрессии

а) Гибридные гены, содержащие описанные цепи антител, как описано ниже, получали с помощью ПЦР и/или генного синтеза и собирали с помощью известных рекомбинантных способов и методов путем соединения соответствующих нуклеотидных сегментов, например, используя уникальные сайты рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности проверяли сиквенированием ДНК. Для временной трансфекции большие количества плазмид получают приготовлением плазмиды из трансформированных культур *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

b) Для создания векторов экспрессии анти-BCMA антитела, вариабельные области последовательностей ДНК тяжелой и легкой цепей субклонировали в рамку считывания либо с константной областью тяжелой цепи IgG1 человека, либо с константной областью легкой цепи IgG1 человека, предварительно вставленную в соответствующий обычный принимающий вектор экспрессии, оптимизированный для экспрессии в клеточных линиях млекопитающих. Экспрессия антитела управляется химерным промотором MPSV, содержащим энхансер ЦМВ и промотор MPSV, за которым следуют 5'-UTR, интрон и элемент MAR каппа Ig. Транскрипция заканчивается синтетической polyA сигнальной последовательностью на 3'-конце CDS. Все векторы несут 5'-концевую последовательность ДНК, кодирующую лидерный пептид, способствующий секреции белков в эукариотических клетках. Кроме того, каждый вектор содержит последовательность EBV OriP для репликации эписомальных плазмид в клетках EBNA, экспрессирующих EBV.

с) Для получения векторов биспецифических антител BCMA×CD3 биспецифические молекулы, полученные из IgG1, состоят по меньшей мере из двух антигенсвязывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами CD3 и BCMA. Антигенсвязывающие фрагменты представляют собой фрагменты Fab, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая из которых содержит вариабельную и константную области. По меньшей мере один из фрагментов Fab представлял собой фрагмент "Crossfab", в котором VH и VL были заменены. Обмен VH и VL внутри фрагмента Fab гарантирует, что фрагменты Fab различной специфичности не имеют идентичного расположения доменов. Конструкция биспецифической молекулы была моновалентной для CD3 и бивалентной для BCMA, где один фрагмент Fab был слит с N-концом внутренней части CrossFab (2+1). Биспецифическая молекула содержала часть Fc, чтобы молекула имела длительный период полужизни. Схематическое представление конструкций приведено в фиг. 2; предпочтительные последовательности конструкций показаны в SEQ ID NO: 39-52. Молекулы были получены путем котрансфекции клеток HEK293 EBNA, растущих в суспензии, экспрессирующими векторами млекопитающих, с использованием раствора на основе полимера. Для приготовления конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими векторами экспрессии в соотношении 1:2:1:1 ("вектор Fc (выступ)": "вектор легкой цепи": "вектор легкой цепи CrossFab": "вектор тяжелой цепи CrossFab").

Методы культивирования клеток

Стандартные методы культивирования клеток применяли, как описано в Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. и Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Временная экспрессия в клетках HEK293 (система HEK293-EBNA)

Биспецифические антитела экспрессировали с помощью временной котрансфекции соответствующими экспрессирующими векторами млекопитающих клеток HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии с использованием раствора на основе полимера. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в количестве 1,5 млн жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавлением 6 mM L-глутамин. Центрифугировали 2,0 млн. жизнеспособных клеток на каждый мл объема конечного продукта (5 мин при 210×g). Аспирировали супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК на каждый мл объема конечного продукта готовили путем смешивания 1 мкг ДНК (соотношение тяжелая цепь: модифицированная тяжелая цепь: легкая цепь: модифицированная легкая цепь=1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимера (1 мг/мл) смесь встряхивали в течение 15 с и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Через 10 мин ресуспендированные клетки и смесь ДНК/раствор на основе полимера объединяли и затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали в встряхивающее устройство (37°C, 5% CO₂). После 3 ч инкубации на каждый мл объема конечного продукта добавляли 800 мкл среды Ex-Cell, дополненной 6 mM L-глутамин, 1,25 mM вальпроевой кислоты и 12,5% Pepsoy (50 г/л). Через 24 ч на каждый мл конечного объема продукта добавляли 70 мкл питательного раствора. Через 7 дней, или когда жизнеспособность клеток составляла или была ниже 70%, клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали с помощью этапа аффинного связывания и одного или двух этапов дополнительной очистки с использованием катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. При необходимости использовали дополнительный этап очистки. Рекомбинантное человеческое анти-BCMA антитело и биспецифические антитела продуцировали в суспензии путем котрансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессирующими векторами млекопитающих с использованием раствора на основе полимера. Клетки трансфицировали двумя или четырьмя векторами, в зависимости от формы. Для IgG1 человека одна плазида кодировала тяжелую цепь, а другая плазида - легкую цепь. Для биспецифических антител котрансфицировали четыре плазмиды. Две из них кодировали две различные тяжелые цепи, а две другие кодировали две различные легкие цепи. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высевали в количестве 1,5 млн жизнеспособных клеток/мл в среду F17 с добавлением 6 mM L-глутамин.

Определение белка

Определение концентрации антител осуществляли путем измерения поглощения при 280 нм, ис-

пользуя теоретическое значение поглощения в 0,1% растворе антитела. Эта величина была основана на аминокислотной последовательности и рассчитана с помощью программного обеспечения GPMW (Lighthouse data).

ДСН-ПААГ электрофорез

Применяли систему NuPAGE® Pre-Cast gel (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. В частности, использовали 10% или 4-12% гели NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) и NuPAGE® MES (восстановленные гели с антиоксидантной добавкой NuPAGE® в рабочем буфере) или MOPS (невосстановленные гели) с рабочим буфером.

Очистка белка

Аффинная хроматография с белком А:

На этапе аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку с белком А (HiTrap Protein A FF, 5 мл, GE Healthcare), уравнивали 6 CV 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5. После этапа промывки тем же буфером антитело элюировали из колонки путем поэтапного элюирования 20 мМ фосфатом натрия, 100 мМ хлорида натрия, 100 мМ глицином, pH 3,0. Фракции с желаемым антителом немедленно нейтрализовали 0,5 М фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Катионообменная хроматография:

Для этапа катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 элюирующим буфером, используемым для этапа аффинного связывания, и загружали в катионообменную колонку (Porous 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки уравнивающим буфером и промывочным буфером соответствующие 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ трис, pH 5,0 и 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ трис, 100 мМ хлорида натрия, pH 5,0, белок элюировали с помощью градиента, используя 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ TRIS, 100 мМ хлорида натрия, pH 8,5. Фракции, содержащие желаемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке на этапе эксклюзионной хроматографии.

Аналитическая эксклюзионная хроматография:

Для этапа эксклюзионной хроматографии концентрированный белок вводили в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), с 20 мМ гистидина, 140 мМ хлорида натрия, pH 6,0 с или без Tween 20, в качестве состава буфера. Фракции, содержащие мономеры, объединяли, концентрировали центрифугированием и стерильно фильтровали в стерильный флакон.

Измерение чистоты и содержания мономера

Чистоту и содержание мономера в конечном белковом препарате определяли с помощью CE-SDS (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, колонка для аналитической эксклюзионной хроматографии (Tosoh)) в буфере 25 мМ фосфата калия, 125 мМ хлорида натрия, 200 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 0,02 мас./об.% азида натрия, pH 6,7.

Подтверждение молекулярной массы с помощью анализов ЖХ-МС

Дегликозирование

Для подтверждения гомогенного состояния препарата молекул конечный белковый раствор анализировали с помощью ЖХ-МС анализов. Для устранения гетерогенности, вносимой углеводами, конструкции обрабатывают PNGaseF (ProZyme). Поэтому pH раствора белка довели до pH 7,0 путем добавления 2 мкл 2 М триса к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGaseF и инкубировали в течение 12 ч при 37°C.

ЖХ-МС анализ - обнаружение в работающем режиме

Способ ЖХ-МС выполняли на ВЭЖХ Agilent 1200, соединенном с масс-спектрометром TOF 6441 (Agilent). Хроматографическое разделение проводили на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6×250 мм; кат. № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05 об./об.% муравьиной кислоты в воде, элюент В представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40°C и 6 мкг (15 мкл) образца белка, полученного обработкой, как описано выше.

Время (мин.)	%В
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

В течение первых 4 мин элюат направляли в отходы для защиты масс-спектрометра от солевого загрязнения. ESI-источник работал с потоком осушающего газа 12 л/мин, температурой 350°C и давлением распылителя 60 фунтов на квадратный дюйм. Спектры МС получали с использованием напряжения

фрагментатора 380 В и диапазоном масс от 700 до 3200 m/z в режиме положительных ионов. Данные МС были получены с помощью программного обеспечения прибора с 4 по 17 мин.

Выделение человеческих МКПК из крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали путем центрифугирования с раствором Histopaque из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарных слоев), полученных из местных банков крови или из свежей крови здоровых доноров-людей. Вкратце, кровь разводили стерильным ФСБ и осторожно наслаивали поверх градиента Histopaque (Sigma, H8889). После центрифугирования в течение 30 мин при $450 \times g$ при комнатной температуре (торможение отключено) убрали часть плазмы над промежуточной фазой, содержащей МКПК. МКПК переносили в новые пробирки Falcon объемом 50 мл и пробирки заполняли ФСБ до общего объема 50 мл. Смесь центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при $400 g$ (тормоз отключен). Супернатант удаляли и осадок МКПК дважды промывали стерильным ФСБ (этапы центрифугирования при $4^\circ C$ в течение 10 мин при $350 g$). Полученную популяцию МКПК подсчитывали автоматически (ViCell) и хранили в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% L-аланил-L-глутамин (Biocrom, K0302) при $37^\circ C$, 5% CO_2 в инкубаторе до начала анализа.

Выделение первичных МКПК яванского макака из гепаринизированной крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали путем центрифугирования в градиенте плотности из свежей крови здоровых доноров-яванских макаков, следующим образом: Гепаринизированную кровь разводили стерильным ФСБ 1:3, а среду Lymphoprep (Axon Lab кат. № 1114545) разводили до 90% стерильным ФСБ. Два объема разведенной крови наслаивали на один объем разбавленного градиента плотности и фракцию МКПК отделяли центрифугированием в течение 30 мин при $520 \times g$ без торможения при комнатной температуре. Шар МКПК переносили в чистую пробирку Falcon объемом 50 мл и промывали стерильным ФСБ путем центрифугирования в течение 10 мин при $400 g$ при $4^\circ C$. Для удаления тромбоцитов выполняли одно низкоскоростное центрифугирование (15 мин при $150 \times g$, $4^\circ C$), и полученную популяцию МКПК автоматически подсчитывали (ViCell) и сразу использовали в дальнейших анализах.

Примеры

Пример 1. Создание анти-BCMA антител

Пример 1.1: Изготовление антигенов и рабочих реагентов

Пример 1.1.1: Рекомбинантный растворимый внеклеточный домен BCMA человека

Внеклеточные домены BCMA человека, яванского макака и мыши, которые использовались в качестве антигенов для отборов фаговым дисплеем, временно экспрессировали в виде N-концевого мономерного Fc-гибрида в клетках НЕК EBNA и сайт-специфически биотинилировали *in vivo* путем ко-экспрессии с биотин-лигазой BirA, по avi-tag распознаваемой последовательности, расположенной на C-конце части Fc, несущей цепочку рецептора (цепь Fc с выступом). Внеклеточные домены BCMA человека и яванского макака содержали последовательность с метионина 4 по аспарагин 53 и с метионина 4 по аспарагин 52, соответственно. Они были слиты через N-концы с шарнирной областью человеческого IgG1, делая возможной гетеродимеризацию с не слитой человеческой частью Fc IgG1 (цепь с отверстием) по технологии "выступы в отверстия".

Пример 1.1.1A: Создание анти-BCMA антител путем созревания

1.1.1A.1 Библиотеки и отборы

Были сконструированы две библиотеки на основе антитела 83A10. Данные библиотеки рандомизировали либо по CDR1 и CDR2 легкой цепи (83A10 L1/L2), либо по CDR1 и CDR2 тяжелой цепи (83A10 H1/H2), соответственно. Каждая из этих библиотек была сконструирована с помощью 2 подряд этапов амплификации и сборки. Продукты окончательной сборки расщепляли NcoI/BsiWI для библиотеки 83A10 L1/L2, MunI и NheI для библиотеки 83A10 H1/H2, наряду с аналогично обработанными акцепторными векторами на основе плазмидных препаратов клона 83A10. Следующие количества расщепленных рандомизированных (частичных) V-доменов и расщепленного акцепторного вектора(ов) лигировали для соответствующих библиотек (мкг V-домена/мкг вектора): библиотеки a.m.83A10 L1/L2 (3/10), библиотеки 83A10 H1/H2 (3/10). Собирали очищенные лигаты библиотек 83A10 L1/L2 и 83A10 H1/H2, соответственно, и использовали для 15 трансформаций клеток TG1 E. coli для каждой из 2 библиотек, чтобы получить окончательные размеры библиотек, составляющие $2,44 \times 10^{10}$ для библиотеки 83A10 L1/L2, и $1,4 \times 10^{10}$ для библиотеки a.m.83A10 H1/H2. Фагмидные частицы, демонстрирующие данные библиотеки Fab, были выделены и очищены.

1.1.1 A.2 Отбор клонов

Отборы проводили против эктодомена B-клеточного антигена созревания (BCMA) человека или яванского макака, к которому был клонирован выше по рамке считывания Fc и avi-тэг. Перед отборами истощающий Fc компонент наносили на планшеты с нейтравидином в концентрации 500 нМ. Отборы проводились по следующей схеме:

1) связывание примерно 10^{12} фагмидных частиц библиотеки 83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 с иммобилизованным истощающим Fc компонентом в течение 1 ч,

2) перенос несвязанных фагмидных частиц библиотеки .83A10 L1/L2 или библиотеки 83A10 H1/H2 к 50, 25, 10 или 2 нМ ВСМА человека или яванского макака (в зависимости от библиотеки и раунда отбора) на 20 мин,

3) добавление магнитных стрептавидиновых гранул на 10 мин,

4) промывка магнитных стрептавидиновых гранул с использованием 10×1 мл ФСБ/Tween® 20 и 10×1 мл ФСБ,

5) элюирование фаговых частиц путем добавления 1 мл 100 мМ ТЕА (триэтиламин) в течение 10 мин и нейтрализация путем добавления 500 мкл 1М Tris®/HCl pH 7,4 и

6) повторное инфицирование клеток TG1 E.coli в лог-фазе, заражение вспомогательным фагом VCSM13 и последующее осаждение ПЭГ/NaCl фагмидных частиц для использования в последующих раундах отбора.

Отборы проводили в течение 3 раундов и условия были скорректированы в 5 оптимизирующих потоках для каждой из 2 библиотек по отдельности. Подробно параметры отбора представляли собой

оптимизирующий поток 1 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА человека для раунда 3),

оптимизирующий поток 2 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 10 нМ ВСМА человека для раунда 2, 2 нМ ВСМА человека для раунда 3), оптимизирующий поток 3 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА человека для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3), оптимизирующий поток 4 (50 нМ ВСМА человека для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3), оптимизирующий поток 5 (50 нМ ВСМА яванского макака для раунда 1, 25 нМ ВСМА яванского макака для раунда 2, 10 нМ ВСМА яванского макака для раунда 3).

Тяжелые цепи антител Mab 21, Mab 22, Mab 33 и Mab 42 к ВСМА были получены в оптимизирующем потоке 5, в котором использовался только ВСМА яванского макака.

1.1.1A.3 Способ скрининга

Отдельные клоны экспрессировали бактериально в виде 1 мл культур в 96-луночном формате, и супернатанты подвергали скринингу с помощью ИФА. Конкретные связыватели определяли как сигналы, большие чем 5-кратный фон для ВСМА человека и яванского макака, и как сигналы, ниже чем 3-кратный фон для истощающих Fc элементов. Полосочные 96-луночные плашки с нейтравидином покрывали 10 нМ ВСМА человека, 10 нМ ВСМА яванского макака или 50 нМ истощающего Fc компонента, с последующим добавлением Fab-содержащих бактериальных супернатантов и детектированием специфически связывающихся Fab через их тэги Flag путем использования вторичного антитела против Flag/HRP. ИФА-положительные клоны экспрессировали бактериально в виде 1 мл культур в 96-луночном формате, и супернатанты подвергались кинетическому скринингу в эксперименте ProteOn. Было идентифицировано 500 положительных клонов, большинство из которых имеют сходную аффинность.

1.1.1A.4 Скрининг поверхностным плазмонным резонансом с растворимыми Fab и IgG

С помощью ППР (поверхностный плазмонный резонанс) были дополнительно протестированы 70 клонов. Все эксперименты проводили при 25°C с использованием PBST в качестве рабочего буфера (10 мМ ФСБ, pH 7,4 и 0,005 об./об.% Tween®20). Биосенсор ProteOn XPR36, снабженный сенсорными чипами GLC и GLM, и реагенты для связывания (10 мМ ацетат натрия, pH 4,5, сульфо-N-гидроксисукцинимид, 1 -этил-3-(3-диметиламинпропил)-карбодимид гидрохлорид [EDC] и этаноламин) были приобретены у BioRad Inc. (Геркулес, Калифорния). Иммуобилизации проводили при 30 мкл/мин на чипе GLM. pAb (коза) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичный Ab (Джексон) связывали в вертикальном направлении, используя стандартную процедуру аминного связывания: все шесть лигандных каналов активировали в течение 5 мин смесью EDC (200 мМ) и сульфо-NHS (50 мМ). Сразу после активации поверхностей в течение 5 мин через все шесть каналов инъецировали pAb (коза) анти-IgG человека, F(ab)₂-специфичное антитело (50 мкг/мл, 10 мМ ацетата натрия, pH 5). Наконец, каналы блокировали 5-минутной инъекцией 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5). Конечные уровни иммуобилизации были похожими на всех каналах, в пределах от 11000 до 11500 RU. Варианты Fab были захвачены из супернатантов E. coli путем одновременной инъекцией по пяти отдельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 мин, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до 900 RU, в зависимости от концентрации Fab в супернатанте; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль "в системе" в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 мин. Кинетические данные были проанализированы в ProteOn Manager v. 2.1. Обработка данных реакции точки включала применение этапа межточкового сопоставления и шага двойного сопоставления с применением буферного контроля "в системе" (Myszka, 1999). Обработанные данные из повторных однократных инъекций соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 без переноса массы (O'Shannessy et al., 1993).

Для измерения IgG из супернатантов продуктов НЕК в 6-луночном формате, варианты IgG были захвачены из супернатантов НЕК293 путем одновременной инъекцией по пяти отдельным целым горизонтальным каналам (30 мкл/мин) в течение 5 мин, что дало в результате уровни в диапазоне от 200 до

400 RU; в шестой канал вводили кондиционную среду, чтобы получить контроль "в системе" в целях двойного сопоставления. Однократные кинетические измерения выполняли путем введения серии разведений ВСМА человека, яванского макака и мыши (25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0 нМ, 50 мкл/мин) в течение 3 мин по вертикальным каналам. Диссоциацию проверяли в течение 5 мин. Кинетические данные были проанализированы как описано выше. Измерения ОСК приведены в табл. 2D; н/и, неокончателное измерение. Было обнаружено, что аффинность к ВСМА человека составляет от около 50 пМ до 5 нМ. Было обнаружено, что аффинность к ВСМА яванского макака составляет от около 2 до 20 нМ (некоторые клоны выходят за пределы диапазона, смотрите фиг. 17). 1.1.1A5. Дополнительный отбор клонов HC и LC

Благодаря своему опыту авторы изобретения отобрали из этих 70 клонов еще 27 клонов на основании их свойств связывания с ВСМА человека, ВСМА яванского макака, ВСМА мыши, и соотношения, измеренного в различных анализах. Из этих клонов были отобраны клоны 4VH и 9VL, что дало в результате 34 комбинации VH/VL. Аффинность связывания измеряли на клетках НЕК-ВСМА человека (НЕК-huBCMA) (фиг. 18 и табл. 2E). Было обнаружено, что связывание антител Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 и Mab 42 с huBCMA на клетках НЕК не было значительно лучше, чем связывание Mab 83A10 с клетками huBCMA-НЕК. Однако Mab 21, Mab 22, Mab27, Mab33, Mab39 и Mab42 были отобраны благодаря их общим свойствам, таким как аффинность к ВСМА человека, ВСМА яванского макака, связывание в качестве биспецифического антитела с ВСМА-положительными клеточными линиями множественной миеломы H929, L363 и RPMI-8226 в проточной цитометрии, уничтожение миеломных клеток H929, L363 и RPMI-8226, жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациента, и данным фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики (уничтожение ВСМА-положительных клеток) у яванских макаков.

Таблица 2С. Связь антител с оптимизационными потоками

Mab №	Получено из библиотеки 2 (HC)	Клон HC	Получено из библиотеки 1 (LC)	Клон LC
Mab 21	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 22	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 1	1C05
Mab 27	Оптимизационный поток 1	1A08	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 33	Оптимизационный поток 5	5D03	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 39	Оптимизационный поток 2	2E12	Оптимизационный поток 1	1D04
Mab 42	Оптимизационный поток 5	5F04	Оптимизационный поток 5	5A11

Таблица 2D. Однократные кинетические измерения аффинности к ВСМА человека, яванского макака и мыши

Mab №	VH	VL	КД		
			ВСМА человека (huBCMA)	ВСМА яванского макака (суBCMA)	ВСМА мыши (muBCMA)
83A10	pCON1532	pCON1080	1,5E-09	1,4E-08	н/и
Mab 21	pCON1531	pCON1522	2,8E-11	5,1E-11	7,3E-10
Mab 22	pCON1531	pCON1521	4,8E-11	н/и	9,0E-10
Mab 27	pCON1520	pCON1522	3,9E-13	1,0E-10	9,7E-10
Mab 33	pCON1530	pCON1522	1,7E-11	3,4E-11	4,9E-10
Mab 39	pCON1524	pCON1522	6,2E-11	2,7E-10	н/и
Mab 42	pCON1531	pCON1527	2,3E-10	3,9E-10	2,5E-09

Таблица 2Е. Связывание вариантов IgG на клетках НЕК-huBCMA

Mab №	VH	VL	Связывание EC50 [нМ]	Связывание EC50 [мкг/мл]
83A10	PCON1532	PCON1080	2,4	0,34
Mab 14	PCON1530	PCON1527	1,47	0,21
Mab 21	pCON1531	PCON1522	2,46	0,35
Mab 22	PCON1531	pCON1521	2,08	0,30
Mab 23	PCON1531	PCON1519	4,97	0,71
Mab 27	PCON1520	PCOM1522	10,57	1,52
Mab 28	PCON1520	PCOM1521	11,34	1,63
Mab 30	PCON1530	PCON1526	10,35	1,49
Mab 31	PCON1530	PCON1525	1,34	0,19
Mab 33	pCOM1530	PCON1522	1,18	0,17
Mab 34	PCON1530	PCON1521	1,24	0,18
Mab 35	PCON1530	PCON1519	1,63	0,23
Mab 39	PCON1524	PCON1522	1,73	0,25
Mab 42	PCON1531	pCON1527	2,10	0,30
Mab 44	PCON1520	PCON1527	1,55	0,22

Пример 1.2: BCMA-экспрессирующие клетки как рабочие инструменты

Пример 1.2.1: Линии миеломных клеток человека, экспрессирующих BCMA на их поверхности, и количественное определение числа рецепторов BCMA на клеточной поверхности

Экспрессию BCMA оценивали на пяти линиях миеломных клеток человека (NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 и JLN-3) с помощью проточной цитометрии. Клетки NCI-H929 ((H929) ATCC® CRL-9068™) культивировали в 80-90% RPMI1640 с 10-20% FCS (фетальная телячья сыворотка), инактивированной нагреванием, и могло содержать 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия и 50 мкМ меркаптоэтанол.

Клетки RPMI-8226 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) культивировали в среде, содержащей 90% RPMI 1640 и 10% FCS, инактивированной нагреванием. Клетки U266B1 ((U266) ATCC® TIB-196™) культивировали в среде RPMI-1640, модифицированной так, чтобы она содержала 2 mM L-глутамин, 10 mM NEPES, 1 mM пирувата натрия, 4500 мг/л глюкозы и 1500 мг/л бикарбоната натрия, и 15% FCS, инактивированной нагреванием. Клеточную линию L-363 (Институт Лейбница DSMZ - Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур; DSMZ № ACC 49) культивировали в 85% RPMI1640 и 15% FCS, инактивированной нагреванием. Клеточную линию JLN-3 (DSMZ № ACC 541) культивировали в 40% MEM Дульбекко+40% MDM Искова+20% FBS, инактивированной нагреванием. Вкратце, клетки собирали, промывали, подсчитывали количество жизнеспособных, ресуспендировали до 50000 клеток/луночка в 96-луночной круглодонной плашке и инкубировали с анти-huBCMA антителом (Abscam, кат. № ab54834, мышиный IgG1) в количестве 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4°C (для предотвращения интернализации). В качестве изотипного контроля использовали мышиный IgG1 (BD Biosciences, кат. № 554121). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 350×g), дважды промывали и инкубировали с FITC-конъюгированным вторичным антимышиным антителом в течение 30 мин при 4°C. В конце времени инкубации клетки центрифугировали (5 мин при 350×g), дважды промывали буфером FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали на устройстве Cantoll, с запущенным программным обеспечением FACS Diva. Относительное количественное определение числа рецепторов BCMA на плазматической мембране клеток миеломных линий H929, RPMI-8226 и U266B1 оценивали с помощью анализа QIFIKIT (Dako, кат. № K0078, следуя инструкциям производителя). Клетки H929 экспрессировали BCMA человека с самой высокой плотностью, вплоть до 5-6 раз большей чем у других миеломных клеточных линиях. H929 рассматривается как линия миеломных клеток с высокой экспрессией BCMA по сравнению с U266 и L363, которые представляют собой миеломные клетки со средней/низкой экспрессией BCMA, RPMI-8226, которая представляет собой миеломные клетки с низкой экспрессией BCMA, и JLN-3, которая представляет собой миеломные клетки с очень низкой экспрессией BCMA. Табл. 3 подводит итог по данным относительного числа рецепторов BCMA на клеточной поверхности клеток линий множественной миеломы человека в каждом эксперименте (n=5).

Таблица 3. Количественное определение числа рецепторов ВСМА на плазматической мембране человеческих клеток миеломных линий H929, L363, RPMI-8226, U266B1 и JLN-3

Линии миеломных клеток человека	Специфическая антиген-связывающая способность (SABC)				
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4	Эксперимент 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16,970	/	11300	11228	/
U266(B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072
JLN-3	/	/	/	/	650

Пример 2. Анализ связывания ВСМА: поверхностный плазмонный резонанс

Оценка связывания анти-ВСМА антител с рекомбинантным ВСМА с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) производится следующим образом. Все ППР-эксперименты проводили на Biacore T200 при 25°C с HBS-EP в качестве рабочего буфера (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% ПАВ P20, Biacore, Фрайбург, Германия). Определяли avidность взаимодействия между анти-ВСМА антителами и рекомбинантным Fc(kih) ВСМА (человека и яванского макака). Биотинилированный рекомбинантный Fc(kih) ВСМА человека и яванского макака прямо связывали на чипе SA, следуя инструкциям (Biacore, Фрайбург/Германия). Уровень иммобилизации колебался от 200 до 700 RU. Анти-ВСМА антитела пропускали в диапазоне 2-кратных концентраций (от 1,95 до 500 nM) с потоком 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 с. Диссоциацию наблюдали в течение 180 с. Различия в объемном показателе преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного на контрольной проточной ячейке. В данном случае анти-ВСМА антитела проходили через пустую поверхность, предварительно активированную и дезактивированную, как описано в стандартном наборе связывания амина. Видимые кинетические константы были получены с использованием Biacore T200 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Упсала/Швеция), чтобы согласовать уравнения скорости для связывания Ленгмюра 1:1 путем численного интегрирования, несмотря на бивалентность взаимодействия для целей сравнения. Также была определена аффинность взаимодействия между анти-ВСМА антителами и рекомбинантным человеческим Fc(kih) ВСМА. Анти-человеческий Fab антитело (GE Healthcare) прямо связывали на чипе CM5 при pH 5,0, используя стандартный набор для связывания амина (Biacore, Фрайбург, Германия). Уровень иммобилизации составил около 6500 RU. Анти-ВСМА антитело захватывали в течение 90 с при 25 nM. Рекомбинантный человеческий Fc(kih) ВСМА пропускали в 4-кратном диапазоне концентраций (от 1,95 до 500 nM) с скоростью 30 мкл/мин через проточные ячейки в течение 120 с. Диссоциацию наблюдали в течение 120 с. Различия в объемном показателе преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного на контрольной проточной ячейке. Здесь рекомбинантный ВСМА проходил над поверхностью с иммобилизованным анти-человеческий Fab антителом, но на который наносили HBS-EP, а не анти-ВСМА антитело. Кинетические константы были получены с использованием Biacore T100 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Упсала/Швеция), чтобы подогнать уравнения скорости для связывания Ленгмюра 1:1 путем численного интегрирования (табл. 4).

Таблица 4. Константы аффинности, определенные с помощью подогнанных уравнений скорости для связывания Ленгмюра 1:1

Лиганд	Аналит	K _s [1/Мс]	Кот[1/с]	КД[М]
83A10 IgG	huBCMA Fc(kih)	5,07E+05	2,92E-03	5,76E-09
	cytoBCMA Fc(kih)	2,29E+05	2,03E-02	8,86E-08
Mab 21 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,51E+05	4,39E-05	5,16E-11
	cytoBCMA Fc(kih)	4,91E+05	2,35E-04	4,78E-10
Mab 22 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,14E+05	5,15E-05	6,33E-11
	cytoBCMA Fc(kih)	4,54E+05	4,42E-04	9,74E-10
Mab 42 IgG	huBCMA Fc(kih)	8,03E+05	2,98E-04	3,71E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	7,07E+05	4,53E-04	6,41E-10
Mab 27 IgG	huBCMA Fc(kih)	3,59E+05	5,93E-05	1,65E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	2,16E+05	4,55E-04	2,11E-09
Mab 33 IgG	huBCMA Fc(kih)	2,00E+05	3,55E-05	1,78E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	1,32E+05	9,76E-05	7,39E-10
Mab 39 IgG	huBCMA Fc(kih)	3,61E+05	5,58E-05	1,55E-10
	cytoBCMA Fc(kih)	2,15E+05	4,67E-04	2,17E-09

Пример 3. Различия в аффинности для человека/яванского макака (человек/яванский макак)

Исходя из значений аффинности, описанных в примере 2, сравнивали аффинность анти-ВСМА ан-

тител к ВСМА человека в сравнении с ВСМА яванского макака, и вычисляли значения отношения аффинности (различие) яванский макак/человек (табл. 5). Различие в аффинности яванский макак/человек было рассчитано как аффинность антитела к ВСМА яванского макака, разделенная на аффинность к ВСМА человека, и означает, что антитело к ВСМА связывается с ВСМА человека с x -кратной аффинностью связывания, по сравнению с ВСМА яванского макака, где x =величина различия яванский макак/человек. Результаты приведены в табл. 5.

Таблица 5. Аффинность анти-ВСМА антител к ВСМА человека в сравнении с ВСМА яванского макака и значения различия человек/яванский макак

α -ВСМА IgG	Кд для ВСМА человека [M]	КД для ВСМА яванского макака [M]	Различие аффинности яванский макак/человек
83A10	5,76E-09	8,86E-08	15,3
Mab 21	5,16E-11	4,78E-10	9,3
Mab 22	6,33E-11	9,74E-10	15,4
Mab 42	3,71E-10	6,41E-10	1,7
Mab 27	1,65E-10	2,11E-09	12,7
Mab 33	1,78E-10	7,39E-10	4,2
Mab 39	1,55E-10	2,17E-09	14

Пример 4. Создание биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител

Биспецифические анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела были получены в соответствии с WO 2014/122144, который включен посредством ссылки.

Пример 4.1. Анти-CD3 антитела

Как применяется в данном документе, термин "CD3 ϵ или CD3" относится к CD3 ϵ человека, описанному в UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Термин "антитело к CD3, анти-CD3 антитело" относится к антителу, связывающемуся с CD3 ϵ . Предпочтительно антитело содержит переменный домен VH, содержащий CDR SEQ ID NO: 1, 2 и 3 тяжелой цепи в качестве соответственно CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменный домен VL, содержащий CDR SEQ ID NO: 4, 5 и 6 легкой цепи в качестве соответственно CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Предпочтительно антитело содержит переменные домены SEQ ID NO: 7 (VH) и SEQ ID NO: 8 (VL). Анти-CD3 антитело, как описано выше, использовали для получения биспецифических антител к Т-лимфоцитам, которые использовали в следующих примерах.

Пример 4.2. Создание биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в Fc-содержащей 2+1 форме

В качестве исходных материалов были использованы кДНК, кодирующие полные тяжелые и легкие цепи соответствующих анти-ВСМА IgG1 антител, а также анти-CD3 VH и VL кДНК. Для каждого биспецифического антитела были задействованы четыре белковые цепи, включающие в себя тяжелую и легкую цепи соответствующего анти-ВСМА антитела, и тяжелую и легкую цепи анти-CD3 антитела, описанных выше соответственно. Чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов с неправильно спаренными тяжелыми цепями, например с двумя тяжелыми цепями анти-CD3 антитела, используют мутированную гетеродимерную область Fc, несущую "мутации выступ-в-отверстие" и сконструированную дисульфидную связь, как описано в WO 2009080251 и в WO 2009080252. Чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов с ошибочно спаренными легкими цепями, например с двумя легкими цепями анти-ВСМА антитела, к тяжелым и легким цепям анти-CD3 антитела применяют кроссовер CH1 х каппа константой области с использованием методов, описанных в WO 2009080251 и в WO 2009080252.

а) Биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитело в форме 2+1, т.е. биспецифическое (Fab)₂×(Fab) антитело, которое является бивалентным для ВСМА и моновалентным для CD3, будет иметь преимущества в отношении активности, предсказуемости в эффективности и безопасности, потому что оно будет предпочтительно связываться с мишенью ВСМА опухоли и избегать уменьшения антителом к CD3, таким образом, повышается вероятность воздействия лекарственного средства на опухоль.

Были получены бивалентные для ВСМА и моновалентные для CD3 с Fc анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела биспецифической формы 2+1 (то есть биспецифические (Fab)₂×(Fab)), для ранее отобранных антител к ВСМА человека. кДНК, кодирующие полные Fab (домены VH и CH1 тяжелой цепи плюс домены VL и CL легкой цепи) соответствующих анти-ВСМА IgG1 антител, а также кДНК VH и VL анти-CD3, использовали в качестве исходных материалов. Для каждого биспецифического антитела были задействованы четыре белковые цепи, включающие в себя тяжелую и легкую цепи соответствующего анти-ВСМА антитела, и тяжелую и легкую цепи анти-CD3 антитела, описанные выше, соответственно, с областями Fc.

Вкратце, каждое биспецифическое антитело получают одновременной котрансфекцией четырех экспрессирующих векторов млекопитающих, кодирующих соответственно:

- кДНК полной легкой цепи соответствующего антитела к ВСМА;
- гибридную кДНК, создаваемую стандартными способами молекулярной биологии, такими как ПЦР с слайс-перекрывающимися праймерами, кодирующую гибридный белок, состоящий из (в порядке

от N- до C-конца) секреторной лидерной последовательности, Fab (VH, за которым следуют домены CH1) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого глицин (Gly)-серинового (Ser) линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Fab (VH, за которым следуют домены CH1) соответствующего анти-BCMA антитела, описанного выше, гибкого глицин (Gly)-серинового (Ser) линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, VH анти-CD3 антитела, описанного выше, и константного каппа-домена кДНК легкой цепи человека;

в) гибридную кДНК, создаваемую стандартными методами молекулярной биологии, такими как ПЦР с сплайс-перекрывающимися праймерами, кодирующую гибридный белок, состоящий из (в порядке от N-до C-конца) секреторной лидерной последовательности, VL анти-CD3 антитела, описанного выше, константного домена CH1 кДНК IgG1 человека.

Котрансфекция клеток млекопитающих и получение и очистка антител с использованием способов, описанных выше для получения человеческих или гуманизированных антител IgG1, с одной модификацией: для очистки антител первый этап захвата не проводится с использованием белка А, а вместо этого выполняется с использованием колонки для аффинной хроматографии, заполненной смолой, связывающейся с константной областью легкой цепи каппа человека, такой как KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Кроме того, может быть включен дисульфид для увеличения стабильности и выхода, также как и дополнительные остатки, формирующие ионные мостики и увеличивающих выход гетеродимеров (EP 1870459A1).

Для создания векторов биспецифических антител BCMA×CD3, биспецифические молекулы, полученные из IgG1, состоят по меньшей мере из двух антигенсвязывающих фрагментов, способных специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами - CD3 и BCMA. Антигенсвязывающие фрагменты представляли собой фрагменты Fab, состоящие из тяжелой и легкой цепей, каждая из которых содержит вариабельную и константную области. По меньшей мере один из фрагментов Fab представлял собой фрагмент "Crosstab", в котором константные домены тяжелой и легкой цепи Fab были обменены друг на друга. Обмен константных доменов тяжелой и легкой цепей в пределах фрагмента Fab гарантирует, что фрагменты Fab различной специфичности не имеют идентичного расположения доменов и, следовательно, не обмениваются легкими цепями. Конструкция биспецифической молекулы была моновалентной для CD3 и бивалентной для BCMA, причем один фрагмент Fab сливается с N-концом внутреннего CrossFab (2+1). Биспецифическая молекула содержала часть Fc, чтобы иметь более длинный период полужизни. Схематическое представление конструкций приведено на фиг. 1-3; последовательности предпочтительных конструкций показаны в табл. 2А. Молекулы были получены путем котрансфекции клеток HEK293 EBNA, растущих в суспензии, экспрессирующими векторами млекопитающих, с использованием раствора на основе полимера. Для приготовления конструкций 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфицировали соответствующими векторами экспрессии в соотношении 1:2:1:1 ("вектор Fc (выступ)": "вектор легкой цепи": "вектор легкой цепи CrossFab": "вектор тяжелой цепи CrossFab").

Пример 4.3. Создание биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител для сравнения.

Создание BCMA50-sc(Fv)₂ (также известного как BCMA50-BiTE®) анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов биспецифического антитела и применяемых аминокислотных последовательностей было в соответствии с WO 2013072406 и WO 2013072415.

Пример 5. Получение и очистка биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Fc-содержащих (2+1) Т-лимфоцитов антител с вариантами по заряду

Биспецифические анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела были получены и очищены в соответствии с WO 2014/122144, который включен посредством ссылки. Для получения биспецифических антител биспецифические антитела экспрессировали путем временной котрансфекции соответствующих экспрессирующих векторов млекопитающих в клетках HEK293-EBNA, которые культивировали в суспензии, используя раствор на основе полимера. За один день до трансфекции клетки HEK293-EBNA высеивали в количестве 1,5 млн жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell с добавлением 6 mM L-глутамин. Центрифугировали 2,0 млн жизнеспособных клеток на каждый мл объема конечного продукта (5 мин при 210×g). Аспирировали супернатант и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. ДНК на каждый мл объема конечного продукта готовили путем смешивания 1 мкг ДНК (соотношение тяжелая цепь: модифицированная тяжелая цепь: легкая цепь: модифицированная легкая цепь=1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора на основе полимера (1 мг/мл) смесь встряхивали в течение 15 с и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Через 10 мин ресуспендированные клетки и смесь ДНК/раствор на основе полимера объединяли и затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали во встряхивающее устройство (37°C, 5% CO₂). После 3 ч инкубации на каждый мл объема конечного продукта добавляли 800 мкл среды Ex-Cell, дополненной 6 mM L-глутамин, 1,25 mM вальпроевой кислоты и 12,5% Pepsoy (50 г/л). Через 24 ч на каждый мл конечного объема продукта добавляли 70 мкл питательного раствора. Через 7 дней или когда жизнеспособность клеток составляла или была ниже 70% клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и стерильной фильтрацией. Антитела очищали с помощью этапа аффинного связывания и одного или двух этапов

дополнительной очистки с использованием катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. При необходимости использовали дополнительный этап очистки. На этапе аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку с белком А (HiTrap Protein A FF, 5 мл, GE Healthcare), уравнивали 6 CV 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, pH 7,5. После этапа промывки тем же буфером антитело элюировали из колонки путем поэтапного элюирования 20 mM фосфатом натрия, 100 mM хлорида натрия, 100 mM глицином, pH 3,0. Фракции с желаемым антителом немедленно нейтрализовали 0,5 M фосфатом натрия, pH 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке катионообменной хроматографией и/или эксклюзионной хроматографией.

Для этапа катионообменной хроматографии концентрированный белок разбавляли 1:10 элюирующим буфером, используемым для этапа аффинного связывания, и загружали в катионообменную колонку (Poros 50 HS, Applied Biosystems). После двух этапов промывки уравнивающим буфером и промывочным буфером, соответствующие 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM трис, pH 5,0 и 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM трис, 100 mM хлорида натрия, pH 5,0, белок элюировали с помощью градиента, используя 20 mM фосфата натрия, 20 mM цитрата натрия, 20 mM TRIS, 100 mM хлорида натрия, pH 8,5. Фракции, содержащие желаемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, стерильно фильтровали и дополнительно подвергали обработке на этапе эксклюзионной хроматографии.

Для этапа эксклюзионной хроматографии концентрированный белок вводили в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), с 20 mM гистидина, 140 mM хлорида натрия, pH 6,0 с или без Tween 20, в качестве состава буфера. Фракции, содержащие мономеры, объединяли, концентрировали центрифугированием и стерильно фильтровали в стерильный флакон.

Определение концентрации антител осуществляли путем измерения поглощения при 280 нм, используя теоретическое значение поглощения в 0,1% растворе антитела. Эта величина была основана на аминокислотной последовательности и рассчитана с помощью программного обеспечения GPMAW (Lighthouse data). Чистоту и содержание мономера в конечном белковом препарате определяли с помощью CE-SDS (система Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)), соответствующей ВЭЖХ (TSKgel G3000 SW XL, колонка для аналитической эксклюзионной хроматографии (Tosoh)) в буфере 25 mM фосфата калия, 125 mM хлорида натрия, 200 mM моногидрохлорида L-аргинина, 0,02 мас./об.% азида натрия, pH 6,7.

Для подтверждения молекулярной массы конечных белковых препаратов и подтверждения гомогенного препарата молекул конечного белкового раствора использовали жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС). Сначала был проведен этап дегликозилирования. Для удаления гетерогенности, вносимой углеводами, конструкции обрабатывали PNGaseF (ProZyme). Поэтому pH раствора белка доводили до pH 7,0 путем добавления 2 мкл 2 M триса к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGaseF и инкубировали в течение 12 ч при 37°C. Затем было выполнено обнаружение ЖХ-МС в работающем режиме. Способ ЖХ-МС выполняли на ВЭЖХ Agilent 1200, соединенном с масс-спектрометром TOF 6441 (Agilent). Хроматографическое разделение проводили на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6×250 мм; кат. № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05 об./об.% муравьиной кислоты в воде, элюент В представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение проводили при 40°C и 6 мкг (15 мкл) образца белка, полученного обработкой, как описано выше.

В течение первых 4 мин элюат направляли в отходы для защиты масс-спектрометра от солевого загрязнения. ESI-источник работал с потоком осушающего газа 12 л/мин, температурой 350°C и давлением распылителя 60 фунтов на квадратный дюйм. Спектры МС получали с использованием напряжения фрагментатора 380 В и диапазоном масс от 700 до 3200 м/z в режиме положительных ионов. Данные МС были получены с помощью программного обеспечения прибора с 4 по 17 мин.

Фиг. 10 EP 14179705 (включен посредством ссылки) изображает графики CE-SDS (не сжатые) конечных белковых препаратов после различных способов очистки для антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv. Этапы аффинной хроматографии с белком А (РА) и эксклюзионной хроматографии (SEC), применяемые к антителу 83A10-TCB, давали чистоту <30% и 82,8% содержания мономера (А). Когда дополнительные этапы очистки, включая катионообменную хроматографию (cIEX), и этапы эксклюзионной хроматографии конечного размера (re-SEC) применяли к конечным белковым препаратам в (А), чистота увеличивалась до 93,4%, но содержание мономера оставалось тем же, и выход был значительно снижен до 0,42 мг/л. Однако, когда были применены специфические модификации по заряду к анти-BCMA Fab CL-SH1 83A10, а именно к антителу 83A10-TCBsv, уже можно было наблюдать превосходный профиль продуцирования/очистки молекулы TCB, о чем свидетельствуют чистота 95,3%, содержание мономера 100% и выход вплоть до 3,3 мг/л, даже когда применялись этапы очистки РА+cIEX+SEC (С) по сравнению с (В) с профилем производства/очистки, показывающим в 7,9-раз ниже выход и на 17,2% ниже содержание мономера, несмотря на включение дополнительного этапа очистки повторной SEC.

Затем был проведен цикл прямого сравнительного производства для сравнения профиля продуци-

рования/очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBcv для дополнительной оценки преимуществ модификаций по заряду CL-CH1, применяемых к антителам. Молекулы 83A10-TCB и 83A10-TCBcv имеют молекулярную форму, как описано в фиг. 2А. Как изображено на фиг. 11, свойства антител 83A10-TCB и 83A10-TCBcv измерялись параллельно и сравнивались после каждого этапа очистки:

- 1) только аффинная хроматография с белком А (А, В),
- 2) аффинная хроматография с белком А, затем SEC (С, D) и
- 3) аффинная хроматография с белком А, затем SEC, затем cIEX и повторно SEC (Е, F).

Графики CE-SDS (не сжатые) конечных белковых растворов после соответствующих способов очистки для антител 83A10-TCB и 83A10-TCBcv показаны на фиг. 11 EP14179705 (включен посредством ссылки). Как показано на фиг. 11А и 11В в EP 14179705 (включен посредством ссылки), улучшения при применении вариантов по заряду к антителу TCB уже наблюдались после очистки только с помощью аффинной хроматографии с белком А. В таком прямом сравнительном исследовании этап очистки с помощью аффинной хроматографии с белком А, применяемый к антителу 83A10-TCB, дал чистоту 61,3%, выход 26,2 мг/л и содержания мономера 63,7% (11А). Для сравнения, когда антитело 83A10-TCBcv очищали аффинной хроматографией с белком А, все параметры были улучшены - лучшая чистота 81,0%, лучший выход 51,5 мг/л и содержания мономера 68,2% (11 В). Когда применяли дополнительный этап очистки SEC к конечным белковым препаратам, как показано на фиг. 12А и 12В в EP 14179705 (включен посредством ссылки), чистота 83A10-TCB достигла 69,5%, выход 14,1 мг/л и содержание мономера 74,7% (С) по сравнению с 83A10-TCBcv с улучшенной чистотой и содержанием мономеров вплоть до 91,0 и 83,9%, соответственно, и с выходом 10,3 мг/л (D). Несмотря на то, что выход был немного меньше (т.е. на 27% меньше) для 83A10-TCBcv, чем для 83A10-TCB в данном конкретном эксперименте, процент правильной молекулы был намного выше для 83A10-TCBcv, чем для 83A10-TCB, соответственно, 90% по сравнению с 40-60%, по данным ЖХ-МС. В третьем прямом сравнении конечные белковые препараты 83A10-TCB и 83A10-TCBcv из фиг. 11С и 11D EP 14179705 (включен посредством ссылки) объединяли примерно с 1 л (эквивалент) соответствующих конечных белковых препаратов из другой партии очистки (то же приготовление) только после этапа очистки с помощью аффинной хроматографии с белком А. Затем объединенные белковые препараты дополнительно очищали способами очистки cIEX и SEC. Как показано на фиг. 11Е и 11F в EP 14179705 (включен посредством ссылки), постоянно наблюдалось улучшение профиля продуцирования/очистки антитела TCB с вариантами по заряду по сравнению с антителом TCB без вариантов по заряду. После того как было использовано несколько этапов способов очистки (например, PA ± SEC+cIEX+SEC) для очистки антитела 83A10-TCB, была достигнута чистота только 43,1% и было достигнуто содержания мономера 98,3%, но в ущерб выходу, который был снижен до 0,43 мг/л. Процент правильной молекулы, измеренный методом ЖХ-МС, все еще был низким - 60-70%. В конце концов качество конечного белкового препарата было неприемлемым для использования *in vitro*. В противоположность этому, когда к антителу 83A10-TCBcv применялись одинаковые этапы множественной очистки с одинаковой хронологией, достигалась чистота 96,2% и содержание мономера 98,9%, а также 95% правильной молекулы, как измерено ЖХ-МС. Однако выход также значительно снижался до 0,64 мг/л после этапа очистки cIEX. Результаты показывают, что лучшая чистота, более высокое содержание мономера, более высокий процент правильной молекулы и лучший выход могут быть достигнуты с антителом 83A10-TCBcv только после двух стандартных этапов очистки, то есть аффинной хроматографии с белком А и SEC (фиг. 11D EP 14179705), в то время как такие параметры не могут быть достигнуты с 83A10-TCB, даже если были применены дополнительные этапы очистки (фиг. 11Е в EP 14179705). В табл. 12 EP 14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после этапа очистки с белком А. В табл. 13 EP 14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv после этапа очистки с белком А и SEC. В табл. 14 EP 14179705 (включен посредством ссылки) подытожены характеристики 83A10-TCB по сравнению с 83A10-TCVcv с последующим применением белка А и SEC плюс белок А, затем этапов очистки cIEX и ге-SEC. Для табл. 12-14 EP 14179705 (включен посредством ссылки) значения, выделенные жирным шрифтом, подчеркивают превосходные свойства при сравнении между 83A10-TCB и 83A10-TCVcv. За одним исключением (т.е. соответственным количеством выхода, см. табл. 13 в EP 14179705 (включен посредством ссылки)), которое может быть не репрезентативным, все параметры и значения продуцирования/очистки, полученные в результате трех экспериментов прямого сравнения, были лучше для 83A10-TCBcv по сравнению с 83A10-TCB. Общие результаты четко демонстрируют, что преимущества в особенностях продуцирования/очистки могут быть достигнуты с помощью применения модификаций по заряду CL-CH1 к антителам TCB, и что для получения и без того высококачественных белковых препаратов с очень хорошими свойствами изготовления требуется всего два этапа очистки (т. е. аффинная хроматография с белком А и SEC). Исходя из улучшенных свойств продуцирования/очистки 83A10-TCBcv, 21-TCBcv, 22-TCBcv, 27-TCBcv, 33-TCBcv, 39-TCBcv и 42-TCBcv были созданы варианты по заряду, аналогично 83A10-TCBcv.

Таблица 6. Профиль производства/очистки биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапа очистки аффинной хроматографией с белком А

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	61,3	81,0
Выход (мг/л)	26,2	51,5
Количество (мг)	24,3	50,2
Мономер (%)	63,7	68,2
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	н. д.	н. д.

Таблица 7. Профиль производства/очистки биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапов очистки аффинной хроматографией с белком А и эксклюзионной хроматографией

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	69,5	91,0
Выход (мг/л)	14,1	10,3
Количество (мг)	13,1	10,0
Мономер (%)	74,7	83,9
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	40-60	90

Таблица 8. Профиль производства/очистки биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител после этапов очистки 1.

- а) аффинной хроматографией с белком А и эксклюзионной хроматографией и 1;
 б) только аффинной хроматографии с белком А с объединением с 2) катионообменной хроматографией и 3) эксклюзионной хроматографией конечного размера

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	43,1	96,2
Выход (мг/л)	0,43	0,64
Количество (мг)	0,73	1,27
Мономер (%)	98,3	98,9
Правильная молекула по данным ЖХ-МС (%)	60-70%	>95%

Пример 6. Связывание биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител с BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы (проточная цитометрия)

Антитела TCB анти-BCMA/анти-CD3 (21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv, 83A10-TCBcv) анализировали с помощью проточной цитометрии на связывание с BCMA человека на BCMA-экспрессирующих клетках H929, L363 и RPMI-8226. MKN45 (человеческая клеточная линия аденокарциномы желудка, которая не экспрессирует BCMA) использовали в качестве отрицательного контроля. Вкратце, культивируемые клетки собирают, подсчитывают и жизнеспособность клеток оценивают с использованием ViCell. Затем жизнеспособные клетки доводят до 2×10^6 клеток на мл в BSA-содержащем окрашивающем буфере FACS (BD Biosciences).

Дополнительно делали аликвоты по 100 мкл/лунка такой клеточной суспензии в круглодонной 96-луночной плашке и инкубировали с 30 мкл анти-BCMA антитела или соответствующего контроля IgG в течение 30 мин при 4°C. Все анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (и контрольные TCB) титровали и анализировали в конечном диапазоне концентраций от 1 до 300 нМ. Затем клетки центрифугировали (5 мин, 350×g), промывали 120 мкл/лунка окрашивающим буфером FACS (BD Biosciences), ресуспендировали и инкубировали в течение дополнительных 30 мин при 4°C с флуорохром-конъюгированным PE-конъюгированным козьем AffiniPure F(ab')₂ фрагментом, специфическим к человеческому Fc-фрагменту IgG (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Затем клетки дважды промывали окрашивающим буфером (BD Biosciences), фиксировали, используя 100 мкл/лунка буфера для фиксации BD (кат. № BD Biosciences, 554655) при 4°C в течение 20 мин, ресуспендировали в 120 мкл буфера FACS и анализировали с использованием BD FACS Cantoll. Когда это применимо, EC₅₀ рассчитывали с использованием Prism GraphPad (LaJolla, CA, USA), и значения EC₅₀, обозначающие концентрацию антитела, необходимо для

достижения 50% от максимального связывания для связывания анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител с клетками H929, клетками L363 и клетками RPMI-8226 подытожены в табл. 8, 9 и 10 соответственно. Звездочка обозначает оцененные значения EC_{50} как экстраполированные и рассчитанные с помощью программного обеспечения Prism. Не были рассчитаны значения EC_{50} для связывания 21-TCBcv с клетками L363 и связывания 22-TCBcv с клетками RPMI-8226

Таблица 8. Значения EC_{50} для связывания биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы H929

Расчитанное EC_{50}	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	12,0	11,0	7,9	13,6
мкг/мл	1,725	1,589	1,142	1,956

Таблица 9. Значения EC_{50} для связывания биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы L363

Расчитанное EC_{50}	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	17,4	/	30,0	3,8
мкг/мл	2,507	/	4,328	0,5534

Таблица 10. Значения EC_{50} для связывания биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антител с клетками множественной миеломы RPMI-8226

Расчитанное EC_{50}	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
нМ	~ 188428*	6,8	/	13,2
мкг/мл	~ 27151*	0,9817	/	1,907

Пример 7. Продуцирование цитокинов активированными T-лимфоцитами при связывании биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антител с CD3-положительными T-лимфоцитами и BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы (анализ СВА с выделением цитокинов)

Биспецифические анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антитела анализируют на их способность индуцировать опосредованное T-лимфоцитами продуцирование цитокинов de novo в присутствии или в отсутствие человеческих BCMA-экспрессирующих клеток миеломы человека (RPMI-8226, JIN-3). Вкратце, человеческие МКПК выделяют из лейкоцитомбоцитарного слоя и 0,3 миллиона клеток/лунка помещают в круглодонный 96-луночный планшет. В альтернативном варианте, 280 мкл цельной крови здорового донора высевает в каждую лунку 96-луночной плашки с глубокими лунками. BCMA-положительные опухолевые клетки-мишени добавляют для получения конечного соотношения E:T 10:1. Анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела и контроля добавляют до конечной концентрации 0,1 пМ - 10 нМ. После инкубации, составляющей вплоть до 24 ч при 37°C, 5% CO₂, плашку для анализа центрифугируют в течение 5 мин при 350×g и супернатант переносят в новую 96-луночную плашку с глубокими лунками для последующего анализа. Анализ СВА проводили на FACS Cantoll в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II Th1/Th2 цитокинов человека (BD кат. № 551809), либо комбинацию следующих наборов СВА Flex: гранзим В человека (BD кат. № 560304), набор Flex ИНФ-γ человека (BD кат. № 558269), набор Flex ФНО-α человека (BD кат. № 558273), набор Flex ИЛ-10 человека (BD кат. № 558274), набор Flex ИЛ-6 человека (BD кат. № 558276), набор Flex ИЛ-4 человека (BD кат. № 558272), набор Flex ИЛ-2 человека (BD кат. № 558270). В табл. 13 показано, что 83A10-TCBcv индуцировал зависимое от концентрации увеличение выработки цитокинов и сериновой протеазы гранзима В, маркера цитотоксической функции T-лимфоцитов. В табл. 11 приведены значения EC_{50} и количество секретируемых цитокинов/протеаз для каждой концентрации биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антител.

Таблица 11. Секретция цитокинов и протеаз, индуцированная биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 T-лимфоцитов антителами в присутствии клеток RPMI-8226

Цитокины/протеазы	EC_{50} (нМ)	Концентрация 83A10-TCBcv (нМ)						
		0,00064	0,0032	0,016	0,08	0,4	2	10
ФНО-α (пкг/мл)	0,52	-6,95	-6,49	-0,65	46,72	161,24	315,11	371,47
ИЛ-10 (пкг/мл)	0,30	-9,21	1,95	25,17	125,82	401,42	602,64	680,05
Гранзим В (пкг/мл)	0,34	220,54	331,55	889,13	5855,02	15862,84	21270,43	27120,52

Пример 8. Перенаправленная цитотоксичность T-лимфоцитов на клетки миеломы H929 с высокой

экспрессией ВСМА, индуцированная биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (колориметрический анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с высокой экспрессией ВСМА при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с ВСМА на клетках. Вкратце, клетки-мишени Н929 множественной миеломы с высоким уровнем экспрессии ВСМА человека собирали с помощью буфера диссоциации клеток, промывали и ресуспендировали в RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевали в 96-луночную плашку с круглыми доньями и добавляли соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации были в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции ТСВ и контроли были подогнаны до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней Н929 ММ (=100%) определяли путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (=0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т.е. без какого-либо биспецифического антитела к Т-лимфоцитам. После 20-24-часовой или 48-часовой инкубации при 37°C, 5% CO₂, высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC₅₀ измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на фиг. 4, все анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение ВСМА-положительных миеломных клеток Н929, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток Н929 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с ВСМА-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой протестированной концентрации. В табл. 12 подытожены значения EC₅₀ для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток Н929, с высокой экспрессией ВСМА, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 12. Значения EC₅₀ для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток Н929, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами

Анти- ВСМА/анти- CD3 ТСВ антитела	EC ₅₀ (пМ)					
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5	Донор 6
21-ТСВcv	97,1	/	42,1	53,9	38,7	/
22-ТСВcv	53,2	/	42,2	23,2	28,9	/
42-ТСВcv	9,7	/	11,7	7,2	6,8	/
83A10-ТСВcv	3,9	/	8,5	5,0	4,3	1,5

Пример 9. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки L363 с средней/низкой экспрессией ВСМА, индуцированная биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с средней/низкой экспрессией ВСМА при перекрестном связывании конструкции, через связывание антигенсвязывающих фрагментов с ВСМА на клетках. Вкратце, клетки-мишени L363 множественной миеломы с средней/низкой экспрессией ВСМА человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевает в 96-луночную плашку с круглым доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли ТСВ доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффекторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффекторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации, максимальный лизис клеток-мишеней ММ (=100%) определяют путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, индуцируя гибель клеток. Минимальный лизис (=0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффекторными клетками, т.е. без какого-либо биспецифического антитела к Т-лимфоцитам. После 20-24-часовой инкубации при 37°C, 5% CO₂ высвобождение

ние ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC_{50} измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на фиг. 5, все анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение ВСМА-положительных миеломных клеток L363, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток L363 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с ВСМА-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой протестированной концентрации. В табл. 13 подытожены значения EC_{50} для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток L363, с средней/низкой экспрессией ВСМА, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 13. Значения EC_{50} для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток L363, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела	EC50 (нМ)				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
21-ТСВcv	83,6	38,4	18,9	19,1	46,4
22-ТСВcv	97,5	27,7	16,5	14,6	56,0
42-ТСВcv	15,5	16,7	5,2	2,2	10,6
83A10-ТСВcv	16,8	47,8	28,4	12,6	39,0

Пример 10. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки RPMI-8226 с средней/низкой экспрессией ВСМА, индуцированная биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с средней/низкой экспрессией ВСМА при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с ВСМА на клетках. Вкратце, клетки-мишени L363 множественной миеломы с средней/низкой экспрессией ВСМА человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевают в 96-луночную плашку с круглым доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 нМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли ТСВ доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффektorные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффektorными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней ММ (=100%) определяли путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (=0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффektorными клетками, т. е. без какого-либо биспецифического антитела к Т-лимфоцитам. После 20-24-часовой инкубации при 37°C, 5% CO₂, высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ наносили на график в зависимости от концентрации биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител в кривых концентрация-ответ. Значения EC_{50} измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли как концентрацию антитела ТСВ, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ. Как показано на фиг. 6, все анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела (21-, 22-, 42- и 83A10-ТСВcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение ВСМА-положительных миеломных клеток RPMI-8226, измеренное по высвобождению ЛДГ. Лизис клеток RPMI-8226 был специфическим, поскольку контрольное антитело ТСВ, которое не связывается с ВСМА-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует высвобождение ЛДГ даже в самой высокой протестированной концентрации. В табл. 13 подытожены значения EC_{50} для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226, с средней/низкой экспрессией ВСМА, индуцированного анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами.

Таблица 13. Значения EC_{50} для перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами клеток RPMI-8226, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами

Анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела	EC50 (пМ)				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
21-TCBcv	/	41,3	8,8	4,0	8,4
22-TCBcv	/	47,6	7,6	3,2	5,5
42-TCBcv	/	382,8	18,7	3,5	1,5
83A10-TCBcv	/	620,5	229,3	35,0	64,9

Пример 11. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные клетки JN-3 с низкой экспрессией BCMA, индуцированная биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (анализ высвобождения ЛДГ)

Анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела также анализировали на их способность индуцировать апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами, в клетках ММ с низкой экспрессией BCMA при перекрестном связывании конструкции, через связывание антиген-связывающих фрагментов с BCMA на клетках. Вкратце, клетки-мишени JN-3 множественной миеломы с низкой экспрессией BCMA человека собирают с помощью буфера диссоциации клеток, промывают и ресуспендируют в RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen). Примерно 30000 клеток/лунка высевают в 96-луночную плашку с круглым доньями и добавляют соответствующее разведение конструкции для достижения желаемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находятся в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для надлежащего сравнения все конструкции и контроли TCB доводятся до одинаковой молярности. МКПК человека (эффеторные клетки) добавляли в лунки, чтобы получить конечное соотношение Е:Т, составляющее 10:1, соответствующее соотношению Е:Т, составляющему примерно от 3 до 5 Т-лимфоцитов на 1 опухолевую клетку-мишень. Отрицательные контрольные группы были представлены только эффеторными клетками или клетками-мишенями. Для нормализации максимальный лизис клеток-мишеней ММ (=100%) определяли путем инкубации клеток-мишеней с конечной концентрацией 1% Triton X-100, вызывая гибель клеток. Минимальный лизис (=0%) был представлен клетками-мишенями, инкубированными вместе только с эффеторными клетками, т.е. без какого-либо биспецифического антитела к Т-лимфоцитам. и) После 48 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂, культивированные клетки миеломы собирали, промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом, и аннексином-V для определения апоптотических миеломных клеток. Окрашивающая панель состояла из CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/аннексин-V-PerCP-Cy5.5. Используемые антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния). Сбор данных осуществляли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных использовалась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). Аннексин-V измеряли на клетках JN-3 и процент аннексин-в-положительных клеток JN-3 наносили на график в зависимости от концентрации биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител. Процент лизиса клеток JN-3, вызванный определенной концентрацией биспецифического анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела, определяли путем измерения абсолютного количества аннексин-V-отрицательных клеток JN-3 при данной концентрации TCB и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-отрицательных клеток JN-3 без TCB; деля на абсолютное количество аннексин-V-отрицательных клеток JN-3 без TCB. Фиг. 7 иллюстрирует то, что все анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (22-, 42- и 83A10-TCBcv) индуцировали зависимое от концентрации уничтожение миеломных клеток JN-3 с низкой экспрессией BCMA, измеренное с помощью проточной цитометрии. Лизис клеток JN-3 был специфическим, поскольку контрольное антитело TCB, которое не связывается с BCMA-положительными клетками-мишенями, а только с CD3 на Т-лимфоцитах, не индуцирует лизис аннексин-V-положительных клеток JN-3 или клеток JN-3 даже в самой высокой протестированной концентрации. В табл. 14 и 15 подытожены соответственно проценты аннексин-в-положительных клеток JN-3 и проценты лизиса клеток JN-3, индуцированного анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами.

Детекцию ЛДГ также проводят после 20-24 ч или 48 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂. Высвобождение ЛДГ из апоптотических/некротических клеток-мишеней JN-3 ММ в супернатант затем измеряли с помощью набора для обнаружения ЛДГ (Roche Applied Science), следуя инструкциям производителя. Процент высвобождения ЛДГ нанесен на график в зависимости от концентраций биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, в виде кривых концентрация-ответ. Значения EC_{50} измеряли с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) и определяли, как концентрацию антитела TCB, которая приводит к 50% максимального высвобождения ЛДГ.

Таблица 14. Перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами клеток JN-3 с низкой экспрессией ВСМА, индуцированное анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами: процент содержание аннексин-V-положительных клеток

Эксперимент 1							
Аннексин-V-положительные клетки JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/ анти-CD3 ТСВ (нМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCVcv	16,78	10,21	9,12	11,11	11,36	8,14	9,6
42-TCVcv	24,83	16,84	8,62	12,3	11,9	/	9,6
22-TCVcv	22,95	26,15	12,48	13,29	9,3	12,48	9,6
Контрольное ТСВ	8,84	/	/	/	/	/	/
Эксперимент 2							
Аннексин-V-положительные клетки JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/ анти-CD3 ТСВ (нМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCVcv	22,86	17,53	16,5	15,94	14,32	13,07	10,74
42-TCVcv	26,88	21,68	14,42	13,6	13,47	12,75	10,74
22-TCVcv	29,72	26,97	18,35	15,94	15	14,8	10,74
Контрольное ТСВ	12,82	/	/	/	/	/	/

Таблица 15. Перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами клеток JN-3 с низкой экспрессией ВСМА, индуцированное анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антителами: процент лизиса JN-3 клеток

Эксперимент 1							
Лизис клеток JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/ анти-CD3 ТСВ (нМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCVcv	70,30	26,66	18,43	41,88	24,42	-	0,00
42-TCVcv	92,92	84,02	41,87	38,96	40,29	/	0,00
22-TCVcv	88,02	90,54	56,26	73,56	-4,29	26,28	0,00
Контрольное ТСВ	-6,55	/	/	/	/	/	/
Эксперимент 2							
Лизис клеток JN-3 (%)	Концентрация анти-ВСМА/ анти-CD3 ТСВ (нМ)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCVcv	51,18	25,30	20,12	39,58	-1,88	22,28	0,00
42-TCVcv	90,37	81,12	55,32	39,44	34,94	17,62	0,00
22-TCVcv	91,21	94,12	53,03	41,66	24,36	36,47	0,00
Контрольное ТСВ	4,18	/	/	/	/	/	/

Пример 12. Экспрессия ВСМА в миеломных плазматических клетках костного мозга у пациентов с множественной миеломой

Линии клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес опухолевую мишень, являются очень полезными и практичными инструментами для измерения активности антител ТСВ в отношении индукции цитотоксичности опухолевых клеток в присутствии Т-лимфоцитов и определения значений EC_{50} , а также для ранжирования молекул ТСВ. Однако, несмотря на то, что линии миеломных клеток человека легкодоступны и практичны, имейте в виду, что они не воссоздают гетерогенность множественной миеломы, очень сложного заболевания, которое характеризуется значительной гетерогенностью на молекулярном уровне. Кроме того, линии миеломных клеток не экспрессируют рецептор ВСМА с одинаковой интенсивностью и плотностью, так как некоторые клетки экспрессируют ВСМА сильнее, чем другие (например, клетки H929 в сравнении с клетками RPM1-8226), и такая гетерогенность на клеточном уровне также может наблюдаться среди разных пациентов. В ходе академического сотрудничества с ключевыми лидерами мнений по поводу множественной миеломы изучалось определение экспрессии и плотности ВСМА в образцах пациентов, и оценивались анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антитела с клиническими образцами пациентов. Аспираты крови и костного мозга собирают у пациентов с множественной миеломой после получения информированного согласия в соответствии с руководящими принципами местного этического комитета и Хельсинкской декларацией.

а) Экспрессия ВСМА, обнаруженная с помощью мультипараметрической проточной цитометрии (средняя интенсивность флуоресценции)

Для определения экспрессии рецептора ВСМА в миеломных клетках костного мозга иммунофенотипические анализы проводили с использованием свежееизолированных аспиринов цельного костного мозга. Для иммунофенотипического анализа использовали антикоагулированные образцы цельного костного мозга (этилендиаминтетрауксусная кислота), подвергнутые эритроцитарному анализу K_3 -ЭДТК. Всего 2×10^6 клеток/пробирка окрашивали, лизировали и затем промывали, используя метод прямой иммунофлуоресценции и многоцветное окрашивание, целью которого была специфическая идентификация и иммунофенотипическое охарактеризование злокачественных плазматических клеток, идентифицированных как $CD138^+ CD38^+ CD45^+ CD19^- CD56^+$. Затем клетки окрашивали с использованием панели антител, конъюгированных с флуорохромом, включая, по меньшей мере, $CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC$. Используемые антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния). Собственное APC-конъюгированное антитело к ВСМА человека использовали в иммунофенотипических

анализах. Сбор данных осуществляли с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST). Для анализа данных использовалась программа Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences). Экспрессия ВСМА измерялась в зависимости от популяции злокачественных плазматических клеток, а средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) определялись и сравнивались среди пациентов с миеломой.

Таблица 16. Экспрессия ВСМА в миеломных плазматических клетках костного мозга пациента, обнаруженная с помощью мультипараметрической проточной цитометрии (средняя интенсивность флуоресценции, СИФ)

№ пациента	СИФ _{ВСМА}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678
P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615
P23	159

b) Определение способности связывать специфические антигены ВСМА (количественный анализ с помощью проточной цитометрии)

Был использован способ Qifikit (Dako) для количественной оценки способности специфического связывания ВСМА (SABC) на клеточной поверхности миеломных плазматических клеток костного мозга пациента. Миеломные плазматические клетки, выделенные из аспиратов цельного костного мозга, окрашивали 50 мкл мышиного анти-человеческий ВСМА IgG (BioLegend кат. № 357502) или мышиного контрольного изотипа IgG2a (BioLegend кат. № 401501), разведенного в буфере FACS (ФСБ, 0,1% BSA) до конечной концентрации 25 мкг/мл (или до концентраций насыщения) и окрашивание проводили в течение 30 мин при 4°C в темноте. Затем в отдельные лунки добавляли 100 мкл установочных или калибровочных гранул и клетки, а также гранулы дважды промывали буфером FACS. Клетки и гранулы ресуспендировали в 25 мкл буфера FACS, содержащего конъюгированное с флуоресцеином вторичное анти-мышиное антитело (в концентрациях насыщения), предоставленное Qifikit. Клетки и гранулы окрашивали в течение 45 мин при 4°C в темноте. Клетки промывали один раз и все образцы ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Образцы сразу анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра и установленного программного обеспечения (например, устройства Cantoll, на котором запущено программное обеспечение FACS Diva, или проточного цитометра FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQUEST).

Таблица 17. Специфическая способность связывания антигена (СССА) ВСМА на миеломных плазматических клетках костного мозга пациента, измеренная количественным анализом - проточной цитометрией

№ пациента	СССА _{ВСМА}
P1	н/д
P2	н/д
P3	679
P4	145
P5	957
P6	969
P7	554
P8	4479
P9	350
P10	414
P11	2756
P12	2911
P13	1267
P14	3453
P15	1006
P16	1097
P17	1622
P18	429
P19	1684
P20	383
P21	1602
P22	799
P23	204

Пример 13. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на миеломные плазматические клетки костного мозга пациента в присутствии аутологичных инфильтрирующихся Т-лимфоцитов костного мозга индуцированных биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультипараметрическая проточная цитометрия)

Одна из наиболее значимых и критических характеристик *in vitro* во время доклинической оценки кандидатов с множественной миеломой для лечения антителами ТСВ заключается в том, может ли молекула ТСВ активировать Т-лимфоциты пациента и индуцировать перенаправленное уничтожение Т-лимфоцитами первичных миеломных плазматических клетках из костного мозга пациентов. Чтобы оценить влияние анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антител на индукцию перенаправленного уничтожения Т-лимфоцитами миеломных плазматических клеток костного мозга, аспираты цельного костного мозга собирали у пациентов с множественной миеломой в пробирки с ЭДТК, и сразу использовали для анализа клеточных культур. Соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (отношение Е:Т), присутствующих в образцах цельного костного мозга, определяли и измеряли проточной цитометрией. Вкратце, 200 мкл образцов костного мозга переносили в 96-луночные плашки с глубокими лунками. Разведения анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антител и контрольных антител готовили в стерильной среде и 10 мкл перепарата добавляли в соответствующие лунки до конечных концентраций в диапазоне от 0,1 пМ до 30 нМ. Суспензию костного мозга с антителами смешивают путем осторожного встряхивания, а затем инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 ч, герметизируют парафиновой пленкой. После периода инкубации 20 мкл соответствующего раствора антитела FACS, приготовленного на основе панели антител, включающей CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC/аннексин-V-PerCP-Cy5.5, добавляли в 96-луночную плашку с U-доньями. Антитела, меченные флуорохромом, были приобретены в BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния) и Caltag Laboratories (Сан-Франциско, Калифорния), и было использовано собственное APC-конъюгированное антитело к ВСМА человека. Затем образцы инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, собирали и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Клеточную гибель миеломных клеток определяли путем оценки аннексина-V-положительной экспрессии на основе популяций миеломных клеток CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Затем определяли процент гибели миеломных клеток. Процент лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга пациента, вызванный специфической концентрацией биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела также определяли путем измерения абсолютного количества аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток при данной

концентрации ТСВ, и вычитая его из абсолютного количества аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток без ТСВ; деля на абсолютное количество аннексин-V-отрицательных миеломных плазматических клеток без ТСВ. Для подтверждения специфичности биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, экспрессию аннексина-V также измеряли в других типах клеток костного мозга, таких как Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-лимфоциты. Как показано на фиг. 8, происходил зависимый от концентрации и специфический лизис миеломных плазматических клеток пациента, тогда как лизис Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-лимфоцитов не наблюдался. Кроме того, контрольное ТСВ, которое связывается только с CD3, но не с BCMA, не вызывало гибели миеломных плазматических клеток при самых высоких концентрациях антител ТСВ. Как показано в табл. 18, процент аннексин-V-положительных миеломных клеток костного мозга пациента при самой высокой концентрации (30 нМ) достигал 52,54 и 55,72% для 42-ТСВсv и 22-ТСВсv соответственно по сравнению с 29,31% для 83A10-ТСВсv, приводя к заключению, что 42-ТСВсv и 22-ТСВсv более эффективны, чем 83A10-ТСВсv, для индуцирования гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента.

Таблица 18. Процент аннексин-V-положительных миеломных плазматических клеток из аспириатов костного мозга пациента, индуцированный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3

Т-лимфоцитов антителами

Аннексин-V-положительные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-ТСВсv	29,31	30,95	23,14	15,74	16,76	13,11
42-ТСВсv	52,54	39,87	29,96	10,51	19,6	13,11
22-ТСВсv	55,72	51,71	31,01	14,81	14,19	13,11
Контрольное ТСВ	15,18	10,93	/	/	/	/

В другом исследовании аспириатов костного мозга из 5 разных пациентов с ММ процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток определяли путем установки диапазона отображения данных для популяции аннексин-V-отрицательных клеток и наносили на график в зависимости от концентрации биспецифического анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела. Значения EC₅₀ измеряли и определяли как концентрацию антител ТСВ, которая приводит к 50% максимально жизнеспособных миеломных плазматических клеток. EMAX (%) определяли как максимум жизнеспособных миеломных плазматических клеток в присутствии соответствующего биспецифического анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела. 83A10-ТСВсv было гораздо менее эффективно в индукции лизиса миеломных плазматических клеток, чем 22-ТСВсv и 42-ТСВсv в большинстве из пяти образцов-аспириатов костного мозга пациентов с миеломой (табл. 26; на фиг. 9 в качестве примера показаны кривые зависимости концентрации для 2 из 5 пациенты). Зависимое от концентрации уменьшение жизнеспособных миеломных клеток наблюдалось в 5/5 образцах из пациентов, обработанных 22-ТСВсv или 42-ТСВсv, по сравнению с только 1/5 образцов из пациентов для 83A10-ТСВсv. В табл. 19 показано сравнение 83A10-ТСВсv с 22-ТСВсv и 42-ТСВсv, и влияние биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител на жизнеспособность миеломных плазматических клеток костного мозга. Результаты ясно показывают, что в 4/5 образцов из пациентов было меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга с 22-ТСВсv и 42-ТСВсv (т.е. больше лизиса миеломных плазматических клеток костного мозга), что продемонстрировано более низкими значениями EMAX (%) для 22-ТСВсv и 42-ТСВсv по сравнению с 83A10-ТСВсv в соответствующих образцах из пациентов. Наблюдали зависимый от концентрации и специфичный лизис миеломных плазматических клеток пациента, в то же время не наблюдали лизис незлокачественных клеток костного мозга (данные не показаны).

Таблица 19. Значения EMAX (%) в отношении аннексин-V-отрицательных жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспириатов костного мозга пациентов в присутствии биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител

Образец аспириата костного мозга пациента (Исследование 2)	83A10-ТСВсv	22-ТСВсv	42-ТСВсv
Пациент 001	100	7,6	22,6
Пациент 003	54,3	38,9	44,6
Пациент 004	100	66,6	53,9
Пациент 006	81,8	65,9	73,5
Пациент 007	81,8	48,6	72,8

В ходе дополнительных исследований новых биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител, используемых в данном изобретении, по сравнению с 83A10-ТСВсv, семь свежеприготовленных образцов/аспириатов цельного костного мозга пациентов окрашивали магнитными микрогранулами CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS и собранные фракции с достаточным оставшимся количеством плазматических клеток ММ, обычно >4% миеломных плазматических клеток, использовали в дальнейших эксперимен-

тах. В 24-луночных плашках, 500000 клеток/луночка инкубировали и культивировали в течение 48 ч. Разведения анти-BCMA/анти-CD3 TCB антител и контрольного антитела добавляли в соответствующие лунки до конечной концентрации TCB от 0,1 нМ до 10 нМ. Каждая доза была представлена в трех повторностях. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследовали с помощью двойного окрашивания пропидий йодидом/CD138-PI TC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Как показано на фиг. 10, гистограммы показывают средние значения, нормализованные по среднему значению для трех повторностей соответствующего контроля в виде среды (MC). Для статистического анализа использовался односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста плазматических клеток MM при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Было также показано максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 нМ) по сравнению со контролем-средой. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Biocompare 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение P его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Как показано на фиг. 10А-10G, результаты ясно показывают, что в 7/7 образцах пациентов было меньше жизнеспособных миеломных плазматических клеток костного мозга с 22-TCVcv и 42-TCVcv (т.е. больше лизиса плазматических клеток миеломы костного мозга) по сравнению с 83A10-TCVcv. Табл. 20 демонстрирует процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспириатов костного мозга пациента, обусловленный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, относительно контроля-среды. Табл. 21 показывает значения IMAX10 и IMAX1. Результаты демонстрируют, что 22-TCVcv и 42-TCVcv явно более эффективны, чем 83A10-TCVcv, в индуцировании гибели миеломных плазматических клеток костного мозга пациента. Несмотря на специфический лизис плазматических клеток костного мозга (BMPC), индуцированный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, и наблюдаемый во всех образцах костного мозга пациентов, микросреда костного мозга (BMME) не была затронута в соответствующих образцах (фиг. 10H, изображающая 7 образцов пациентов).

Таблица 20. Относительный процент жизнеспособных миеломных плазматических клеток, отрицательных на пропидий йодид, из аспириатов костного мозга пациентов, обусловленный биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами

Образец из пациента № 1 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	181,3	106,3	31,3	9,4
42-TCVcv	81,3	15,6	9,4	9,4
22-TCVcv	37,5	6,3	6,3	9,4
Контр. TCB	/	/	/	162,5
Образец из пациента № 2 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCVcv	89,5	31,6	5,3	0
42-TCVcv	42,1	10,5	0	0

22-TCVcv	15,8	5,3	0	0
Контр. TCB	/	/	/	94,7
Образец из пациента № 3 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	76,7	35,0	1,7	0
42-TCVcv	13,3	0	0	0
22-TCVcv	3,3	0	0	0
Контр. TCB	/	/	/	86,7
Образец из пациента № 4 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	93,9	51,5	9,1	6,1
42-TCVcv	9,1	0	0	0
22-TCVcv	15,2	15,2	0	0
Контр. TCB	/	/	/	127,3
Образец из пациента № 5 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	100	91,4	62,9	20,0
42-TCVcv	71,4	34,3	22,9	11,4
22-TCVcv	20,0	22,9	14,3	11,4
Контр. TCB	/	/	/	85,7
Образец из пациента № 6 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	55,6	22,2	6,7	4,4
42-TCVcv	35,6	6,7	4,4	4,4
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2
Контр. TCB	/	/	/	117,8
Образец из пациента № 7 / Жизнеспособные миеломные плазматические клетки (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (нМ)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	84,4	82,6	46,8	19,3
42-TCVcv	67,0	33,9	12,8	5,5
22-TCVcv	24,4	3,3	8,9	2,2
Контр. TCB	/	/	/	106,4

Таблица 21. Значения IMAx10 и IMAx1 в отношении максимального ингибирования роста плазматических клеток ММ при 10 нМ IMAx10 и ингибирования при 1 нМ IMAx1 исходя из количества пропидий йодид-отрицательных жизнеспособных миеломных плазматических клеток из аспиратов костного мозга пациентов в присутствии биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител

Образец пациента №	83A10-TCBcv		42-TCBcv		22-TCBcv		Контр. TCB IMAx10 (%)
	IMAx10 (%)	IMAx1 (%)	IMAx10 (%)	IMAx1 (%)	IMAx10 (%)	IMAx1 (%)	
1	90,6	68,8	90,6	90,6	90,6	93,8	-62,5
3	100	94,7	100	100	100	100	5,3
4	100	98,3	100	100	100	100	13,3
5	93,9	90,9	100	100	100	100	-27,3
6	80,0	37,1	88,6	77,1	88,6	85,7	14,3
7	95,6	93,3	95,6	95,6	97,8	91,1	-17,8
8	80,7	53,2	94,5	87,2	97,2	97,2	-6,4

Пример 14. Активация Т-лимфоцитов костного мозга пациента, индуцированная биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультипараметрическая проточная цитометрия)

Чтобы оценить, вызывают ли анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов пациентов с миеломой (т. е. инфильтрированных Т-лимфоцитов (MIL) костного мозга), образцы из соответствующих обработанных, необработанных и контрольных групп после 48 ч инкубации также окрашивали раствором антитела FACS, приготовленным на основе панели антител, включающей в себя восемь маркеров: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. Затем образцы инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, собирали и анализировали с использованием многоцветного проточного цитометра. Активацию Т-лимфоцитов определяли путем оценивания CD25, CD69 и/или HLA-DR-положительной экспрессии, устанавливая диапазон отображения данных для популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Затем были измерены проценты активации Т-лимфоцитов. На фиг. 11 показано зависимое от концентрации повышение экспрессии CD69 и CD25 на инфильтрированных в костный мозг CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах из пациентов с множественной миеломой. Табл. 22 подытоживает увеличение экспрессии CD69 и CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, индуцированной анти-BCMA/анти-CD3 TCB антителами; данные из одного пациента.

Таблица 22. Т-лимфоцитарная активация аутологических Т-лимфоцитов пациента с миеломой, индуцированная биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами в присутствии миеломных плазматических клеток костного мозга пациента

CD69+ / CD4 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	21,8	14,93	1,80	0,93	1,02	0,85
42-TCBcv	29,6	24,8	1,90	1,57	0,94	0,85
22-TCBcv	34,99	30,72	3,62	1,69	2,31	0,85
Контрольное TCB	0,7	0,62	/	/	/	/
CD69+ / CD8 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	25,50	22,07	8,330	5,60	5,14	5,30
42-TCBcv	23,61	24,22	11,125	9,26	6,28	5,30
22-TCBcv	25,48	28,14	11,460	6,64	14,08	5,30
Контрольное TCB	5,71	4,93	/	/	/	/
CD25+ / CD4 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	17,47	12,86	5,18	4,58	4,07	7,5
42-TCBcv	8,65	7,42	3,51	2,71	2,81	7,5
22-TCBcv	12,34	11,52	5,23	4,89	4,90	7,5
Контрольное TCB	6,90	6,50	/	/	/	/
CD25+ / CD8 Т-лимфоциты (%)	Концентрация биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (пМ)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	9,79	6,560	0,42	0,13	0,12	0,12
42-TCBcv	2,20	2,231	0,42	0,14	0,08	0,12
22-TCBcv	3,57	4,110	0,65	0,10	0,08	0,12
Контрольное TCB	0,09	0,100	/	/	/	/

Пример 15. Усиленная Т-лимфоцитарная функция (выработка цитокинов) Т-лимфоцитов костного мозга пациента, индуцированная биспецифическими анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами (мультиплексный иммуноанализ на основе гранул/проточная цитометрия)

Чтобы оценить, индуцируют ли анти-BCMA/анти-CD3 TCB антитела (83A10-TCBcv, 22-TCBcv и 42-TCBcv) Т-лимфоцитарную активацию и усиление функции инфильтрирующихся CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов костного мозга пациентов с миеломой, супернатант собирали из культуры соответствующих обработанных, необработанных и контрольных групп после 48 ч инкубации и измеряли содержание цитокинов и сериновых протеаз. Цитокиновый анализ на гранулах (СВА) проводили на многоцветном проточном цитометре в соответствии с инструкциями производителя, используя либо набор II Th1/Th2 цитокинов человека (BD кат. № 551809), либо комбинацию следующих наборов СВА Flex: гранзим В человека (BD кат. № 560304), набор Flex ИНФ-γ человека (BD кат. № 558269), набор Flex ФНО-α человека (BD кат. № 558273), набор Flex ИЛ-10 человека (BD кат. № 558274), набор Flex ИЛ-6 человека (BD кат. № 558276), набор Flex ИЛ-4 человека (BD кат. № 558272), набор Flex ИЛ-2 человека (BD кат. № 558270).

Пример 16. Фармакокинетическое/фармакодинамическое (ФК/ФД) исследование у яванских макак

Очевидное преимущество, которое может иметь анти-BCMA/анти-CD3 TCBcv антитело по сравнению с другими биспецифическими антителами, такими как (scFV)₂ (например, BCMA×CD3, биспецифический вовлекающий активатор Т-лимфоцитов ViTE®, как описано в WO 2013072415 и WO 2013072406), заключается в значительно более длительном периоде полужизни/более низком клиренсе in vivo, который может позволить введение два раза или один раз в неделю внутривенно или подкожно по сравнению с очень коротким периодом полужизни (scFV)₂ (например, от 1 до 4 ч), требующий лечения с помощью насоса, носимого пациентами от нескольких недель до нескольких месяцев (Torр et al., J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8). Введение два раза или один раз в неделю было бы гораздо более удобным для пациентов, а также намного менее рискованным (например, отказ насоса, проблемы с катетером и т.д.).

а) Для проверки периода полужизни/клиренса анти-BCMA/анти-CD3 83A10-TCBcv антитела in vivo фармакокинетические (ФК) фармакодинамические (ФД) исследования однократной дозы биспецифических анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител (83A10-TCBcv, 22-TCBcv и 42-TCBcv) проводили в AAALAC-аккредитованном CRO. Биологически наивные взрослые яванские макаки в возрасте около двух лет и весом около 3 кг были акклиматизированы в течение не меньше чем 40 дней и отобраны, исходя из массы тела, клинических наблюдений и клинических патологических исследований. Животных идентифицировали по индивидуальным татуировкам и карточкам клеток с цветовой кодировкой. Все процедуры с животными (включая содержание, наблюдение за состоянием здоровья, ограниченное содержание, дозирование и т.д.) и рассмотрение этической приемлемости проводились в соответствии с действующим законодательством страны, обеспечивающим соблюдение Директивы о защите животных, используемых в биомедицинских исследованиях. Животные были случайным образом отнесены к группе лечения на основании самой последней массы тела до тестирования. После исключения животных с недопустимыми результатами предварительных обследований, использовалась компьютерная программа,

включенная в систему Pristima®, предназначенная для достижения баланса в отношении предтестовой массы тела, чтобы исключить животных из обеих крайних значений массы тела и рандомизировать оставшихся животных в группу лечения. Животных распределяли по трем группам лечения 83A10-ТСВсv (n=2 животных, т.е. 1 самка и 1 самец в группе) в количестве 0,003; 0,03; и 0,3 мг/кг. Животные получили одну в/в инъекцию 83A10-ТСВсv, и собирали через периферическую вену по меньшей мере 0,8 мл крови в виде образцов в каждый момент времени для оценки ФК в соответствии со следующим графиком и процедурами сбора: До введения дозы 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после дозирования. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4°C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой в соответствии с следующим графиком сбора: до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4°C). Полученный костный мозг (около 1 мл) хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценку данных ФК. Стандартный не компарментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на фиг. 12 и в табл. 23, сывороточные концентрации 83A10-ТСВсv измеряли с помощью ИФА из образцов сыворотки, собранных в разные моменты времени после в/в инъекции. В табл. 24 показаны концентрации 83A10-ТСВсv в костном мозге, измеренные ИФА для каждой группы лечения (BLQ означает уровень ниже уровня количественного определения).

Некоторая информация, относящаяся к возможному клиническому применению биспецифического антитела, может быть взята из фиг. 12, табл. 23 и 24.

В аспиратах костного мозга из пациентов с ММ концентрации ТСВ 1 нМ или 10 нМ, используемые в данном изобретении, индуцируют значительную или даже полную гибель плазматических клеток ММ; в дозе 0,03 мг/кг в интервале от инъекции до 168 ч (7 дней) были достигнуты концентрации в плазме между примерно 1 и 4 нМ, показывая, что терапия один раз в неделю с дозами примерно 0,03 мг/кг является вполне возможной (200 нг/мл соответствует примерно 1 нМ)

Фиг. 12 показывает, что в исследуемом диапазоне доз ФК в значительной степени является линейной от дозы; это означает, что концентрации пропорциональны дозе; полезное свойство в клинической терапии ММ - это заболевание, в основном локализующееся в костном мозге; концентрации 83A10-ТСВсv, обнаруженные в костном мозге, близки к сывороточным концентрациям (табл. 24), например через 96 ч после инъекции концентрации в костном мозге составляли примерно 1 и 2 нМ; это концентрации ТСВ, используемые в данном изобретении, при которых наблюдается значительное уничтожение плазматических клеток ММ в аспиратах костного мозга, только что взятых у пациентов ММ; снова демонстрируется возможность удобных интервалов дозирования, например, раз в неделю между 24 и 504 ч после инъекции выведение является в основном первого порядка с периодом полужизни примерно от 6 до 8 дней, снова показывая возможность для дозирования, например, раз в неделю

Таблица 23. Сывороточные концентрации 83A10-ТСВсv после в/в лечения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	83A10-ТСВсv					
	0,003 мг/кг в/в		0,03 мг/кг в/в		0,3 мг/кг в/в	
	A	B	C	D	E	F
До дозирования	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30 мин	75,69	74,99	668,66	796,54	17207,20	14943,95
90 мин	70,92	74,56	951,81	628,72	12831,54	16248,97
180 мин	76,54	62,55	981,42	722,27	10653,28	6824,72
7 ч	53,17	77,39	700,67	972,38	8204,77	4560,36
24 ч	33,16	50,41	358,90	532,11	4609,28	4127,41
48 ч	26,05	37,40	279,80	433,30	3546,09	2700,43
96 ч	17,28	19,52	226,01	429,80	1959,96	2006,92
168 ч	17,33	15,87	55,58	365,67	1918,06	1382,57
336 ч	11,21	4,43	102,94	153,54	1102,96	773,55
504 ч	4,33	BLQ	43,99	130,14	952,03	377,04

Таблица 24. Концентрации 83A10-TCBsv в костном мозге после однократного в/в введения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	0,003 мг/кг		0,03 мг/кг		0,3 мг/кг	
	A	B	C	D	E	F
До дозирования	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96 ч	25,07	37,15	179,87	469,08	3432,54	2674,70
336 ч	9,92	6,90	59,39	47,22	1987,48	850,87

Фармакодинамические (ФД) измерения:

Образцы крови (моменты времени: до введения дозы, через 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения дозы) и образцы костного мозга (моменты времени: до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы) собирали в пробирки, содержащие 7,5% КЗ ЭДТК для оценки ФД с помощью проточной цитометрии, чтобы оценить эффект 83A10-TCBsv, предоставляемого в/в в виде однократной дозы, на плазматические клетки крови и костного мозга, В-лимфоциты и Т-лимфоциты. Был применен способ прямого иммунофлуоресцентного окрашивания "лизис и промывка" поверхностных маркеров. Вкратце, 100 мкл крови или костного мозга инкубировали с двумя смесями антител, включая CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 или CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8 в темноте в течение 30 мин при +4°C. Для лизиса эритроцитов к образцу добавляли 2 мл лизирующего буферного раствора и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки собирали центрифугированием и промывали окрашивающим буфером (ФСБ 2% фетальная бычья сыворотка). Окрашенные образцы хранили в холодильнике, защищали от света до обнаружения в цитометре в тот же день. Сбор данных FACS выполняли с помощью проточного цитометра Becton Dickinson, оснащенного 488 и 635 лазерными линиями, BD FACS Canto II. Программное обеспечение BD FACSDiva использовалось для сбора и анализа данных. Подсчет абсолютного числа клеток проводили с двойной платформой, исходя из подсчета WBC, полученном гематологическим анализатором (ADVIA™ 120, Siemens). Как показано на фиг. 13, перераспределение периферических Т-лимфоцитов наблюдалось у всех животных, получавших однократную внутривенную дозу 83A10-TCBsv, что отображено уменьшением количества циркулирующих Т-лимфоцитов. Как показано на фиг. 14А, уже через 24 ч после обработки с помощью 83A10-TCBsv 0,3 мг/кг наблюдалось снижение количества плазматических клеток крови (ВСМА-положительных клеток) у животных, получавших лечение, в то же время не наблюдали снижения общего количества В-лимфоцитов (ВСМА-отрицательные клетки). На фиг. 14b показана кинетика уменьшения плазматических клеток в крови после обработки 0,3 мг/кг 83A10-TCBsv у яванских макак.

Образцы крови также обрабатывали для сбора плазмы для анализа цитокинов (ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α и ИНФ-γ) в соответствии со следующей схемой сбора: до введения дозы, 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168 ч после введения дозы. Образцы крови помещали в пластиковые пробирки, удерживали в бане с ледяной водой, затем центрифугировали (по меньшей мере 10 мин, 1200 г, +4°C). Полученную плазму хранили непосредственно при -80°C до анализа. Анализ цитокинов проводили с помощью мультиплексного иммуноанализа цитокинов на основе гранул Multiplex (Luminex Technology). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad): использовалась пятипараметрическая модель логистической регрессии (SPL).

b) В дополнительном исследовании яванских макак обрабатывали 42-TCBsv или 22-TCBsv. Животные (n=2 в группе) получали однократную в/в (0,01; 0,1; 1,0 мг/кг) или п/к (0,01 и 0,1 мг/кг) инъекцию 42-TCBsv или однократную в/в инъекцию 22-TCBsv (0,1 мг/кг). Образцы крови и костного мозга отбирали в моменты времени в соответствии с установленным графиком сбора и обрабатывали соответствующим образом для измерения ФК и ФД (иммунофенотипирование и продуцирование цитокинов).

Животные получали одну в/в или п/к инъекцию 42-TCBsv или 22-TCBsv (только в/в) и образцы крови в определенный момент времени собирали через периферическую вену для оценки ФК в соответствии со следующим графиком и процедурами сбора: до введения дозы 30, 90, 180 мин, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 ч после введения дозы. Образцы крови оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4°C). Полученную сыворотку (около 300 мкл) хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Образцы костного мозга для оценки ФК также собирали с бедренной кости под наркозом/обезболивающей обработкой в соответствии с следующим графиком сбора: до введения дозы, через 96 и 336 ч после введения дозы. Образцы костного мозга оставляли для свертывания в пробирках для отделения сыворотки на 60 мин при комнатной температуре. Сгусток осаждали центрифугированием (по меньшей мере 10 мин, 1200g, +4°C). Полученный костный мозг (около 1 мл) хранили непосредственно при -80°C до дальнейшего анализа. Выполняли анализ и оценивание ФК данных. Стандартный не компартментный анализ проводили с использованием пакета Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, США) или системы Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, США). Как показано на фиг. 19 и в табл. 24A-D, концентрации 42-TCBsv измеряли с помощью ИФА образцов сыворотки и образцов костного мозга, собранных в разные моменты времени после в/в или п/к инъекции. Диапазон эффективных концентраций 42-TCBsv в аспиратах костного мозга пациентов с множественной миеломой

составляет от 10 пМ до 10 нМ (серая зона). Концентрации в скобках указаны в нМ. BLQ, ниже уровня количественного определения; н/и, неокончателное измерение.

Таблица 24А. Сывороточные концентрации 42-ТСВсв после в/в лечения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	42-ТСВсв					
	0,01 мг/кг в/в		0,1 мг/кг в/в		1,0 мг/кг в/в	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
До дозирования	BLQ	BLQ	н/и	BLQ	BLQ	BLQ
30 мин	468,57	613,44	4720,33	4506,64	41939,31	32677,23
90 мин	333,09	427,16	4284,66	3214,61	30889,73	103925,73
180 мин	392,37	422,36	4336,89	2865,36	29201,69	36157,78
7 ч	421,96	356,34	4028,47	3070,84	25064,81	29962,62
24 ч	242,64	305,74	2996,24	2321,66	19365,86	23656,65
48 ч	н/и	192,97	2595,62	1781,91	20539,59	13523,68
96 ч	128,50	148,02	2153,34	1277,02	13147,09	12755,58
168 ч	51,13	72,64	1388,24	948,31	6189,79	3952,05
336 ч	27,68	13,03	195,51	190,87	5337,85	54,15
504 ч	18,17	8,04	275,93	13,96	3678,69	37,88

Таблица 24В. Концентрации 42-ТСВсв в костном мозге после однократного в/в введения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	42-ТСВсв					
	0,01 мг/кг в/в		0,1 мг/кг в/в		1,0 мг/кг в/в	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самцы	Самки
До дозирования	BLQ	BLQ	406,99	BLQ	BLQ	BLQ
96 ч	54,39	130,03	956,56	1022,87	4089,88	4339,33
336 ч	27,23	18,49	227,20	170,34	3705,74	62,44

Таблица 24С. Сывороточные концентрации 42-ТСВсв после п/к лечения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	42-ТСВсв				
	0,01 мг/кг п/к		0,1 мг/кг п/к		
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самки
До дозирования	4,76	12,41	BLQ	BLQ	
30 мин	8,25	12,51	25,11	14,62	
90 мин	16,38	22,71	140,73	145,39	
180 мин	23,75	48,51	334,95	269,66	
7 ч	37,46	63,48	836,86	565,10	
24 ч	68,15	115,31	2100,42	904,22	
48 ч	116,63	118,03	1956,60	1111,06	
96 ч	150,77	120,62	1810,13	1817,52	
168 ч	106,28	98,64	1192,65	1653,26	
336 ч	67,02	46,21	482,39	571,04	
504 ч	25,69	31,99	4,08	83,91	

Таблица 24Д. Концентрации 42-ТСВсв в костном мозге после однократного п/к введения у яванских макак

Конц. (нг/мл)	42-ТСВсв			
	0,01 мг/кг п/к		0,1 мг/кг п/к	
	Самки	Самцы	Самки	Самки
До дозирования			BLQ	BLQ
96 ч	5,59	10,70	1064,66	1066,79
336 ч	29,35	48,78	518,40	906,48

Результаты из табл. 24А и 24С показывают привлекательный профиль сывороточной концентрации, подходящий для лечения один раз в неделю или даже один раз в две недели с помощью 42-ТСВсв. Была определена площадь под кривой (AUC) для сывороточных концентраций после в/в и п/к введений, сравнение значений AUC показало высокую биодоступность, близкую к 100%, при п/к инъекции 42-ТСВсв. Кроме того, результаты показывают, что концентрация 42-ТСВсв в костном мозге весьма подобна концентрации 42-ТСВсв в сыровотке. Концентрации 42-ТСВсв в сыровотке могут хорошо отображать концентрации 42-ТСВсв, доступные в костном мозге, то есть в основном месте, где образуются миеломные опухолевые клетки.

Фармакодинамические (ФД) измерения представляют собой ценную информацию, подкрепляющую измерения ФК. Были выполнены дополнительные ФД параметры. CD20⁺ В лимфоциты яванского макака, полученные из крови, также экспрессируют ВСМА на клеточной поверхности и встречаются значительно чаще (более высокое абсолютное число), чем плазматические клетки в крови. Деплетирование В-

лимфоцитов крови использовали в качестве надежного фармакодинамического эффекта анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антител и для сравнения эффективности *in vivo* между 83A10-TCBvc, 42-TCBvc и 22-TCBvc. Абсолютное количество В-лимфоцитов рассчитывали на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета лейкоцитов, полученного с помощью гематологического анализатора, и измеренных в следующие моменты времени: до введения дозы через 24, 48, 96 и 196 ч после 10-минутной в/в инфузии.

Процент деплетирования В-лимфоцитов рассчитывали следующим образом: $[\text{абсолютное количество В-лимфоцитов до введения дозы}] - [\text{абсолютное количество В-лимфоцитов в момент времени}] / [\text{абсолютное количество В-лимфоцитов до введения дозы}] \times 100$

Таблица 24Е. Фармакодинамические эффекты анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антител:

Время после в/в инъекции (часы)	Деплетирование В-лимфоцитов		
	Деплетирование В-лимфоцитов относительно количества до введения дозы (%)		
	83A10-TCBvc 0,3 мг/кг (n = 2)	42-TCBvc 0,1 мг/кг (n=2)	22-TCBvc 0,1 мг/кг (n=2)
24 ч	19,9 ± 0,21	91,4 ± 3,8	77,8 ± 3,7
48 ч	11,9 ± 17,6	88,8 ± 3,9	61,5 ± 9,8
96 ч	5,0 ± 10,8	93,0 ± 7,2	89,2 ± 4,8
168 ч	-0,23 ± 61,4	96,6 ± 3,5	91,9 ± 3,9

42-TCBvc и 22-TCBvc более эффективны, чем 83A10-TCBvc, для индукции деплетирования BCMA-экспрессирующих В-лимфоцитов у яванских макаков после однократной в/в инъекции (см. табл. 24Е). Поскольку данные три молекулы имеют одинаковую молекулярную структуру и связыватель CD3, различие в эффективности у яванских макаков может быть в основном связано с соответствующим антителом к BCMA.

Чтобы подтвердить, что деплетирование BCMA-экспрессирующих В-лимфоцитов у яванских макаков после в/в инъекции является результатом механистического фармакодинамического эффекта анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антител, было измерено увеличение количества активированных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (т.е. эффекторных клеток) в костном мозге, обогащенном BCMA-положительными клетками (т.е. клетками-мишенями) через 4 дня (96 ч) и 3 недели (336 ч) после в/в инъекции. Абсолютное количество CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-лимфоцитов было рассчитано на основе двойной платформы, состоящей из проточной цитометрии и подсчета лейкоцитов, выполненного с помощью гематологического анализатора.

Таблица 24F. Фармакодинамические эффекты анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антител:

Увеличение количества CD8⁺ CD25⁺ активированных Т-лимфоцитов

Время после в/в инъекции (часы)	Увеличение количества CD8 ⁺ CD25 ⁺ активированных Т-лимфоцитов относительно количества до введения дозы (%)		
	83A10-TCBvc 0,3 мг/кг (n = 2)	42-TCBvc 0,1 мг/кг (n=2)	22-TCBvc 0,1 мг/кг (n=2)
96 ч	284 ± 244 %	585 ± 496 %	1449 ± 1715 %
336 ч	-0,9 ± 1,3%	110 ± 187 %	-6,6 ± 45,3 %

42-TCBvc и 22-TCBvc более эффективны, чем 83A10-TCBvc, для индукции активации Т-лимфоцитов у яванских макаков после однократной в/в инъекции (см. табл. 24F). Поскольку данные три молекулы имеют одинаковую молекулярную структуру и связыватель CD3, различие в фармакодинамическом эффекте у яванских макаков может быть в основном связано с соответствующим антителом к BCMA. Результаты показывают, что деплетирование BCMA-положительных В-лимфоцитов в костном мозге и в крови, скорее всего, является результатом активации цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцированной анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антителами.

Пример 17. Противоопухолевая активность, индуцированная биспецифическим анти-BCMA/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителом в модели ксенотрансплантата миеломы H929 человека с использованием гуманизированных по МКПК мышей NOG

С длительным периодом полужизни Fc-содержащие анти-BCMA/анти-CD3 TCBvc антитела могут быть более эффективными, чем биспецифические антитела на основе (scFv)₂, такие как BCMA50-BiTE®, вводимые в эквимольных дозах, по схеме один раз в неделю. Эффект *in vivo* 83A10-TCBvc и BCMA50-BiTE® (как описано в WO 2013072415 и WO 2013072406) сравнивался и оценивался в модели ксенотрансплантата миеломы H929 человека у гуманизированных по МКПК мышей NOG. Мыши NOG являются подходящими моделями гуманизированных мышей, поскольку у них полностью отсутствуют иммунные клетки, включая резидентную популяцию NK-лимфоцитов, и поэтому они более восприимчивы к приживлению опухолевых человеческих ксеногенных клеток (Ito et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 53-76). Вкратце, в День 0 (Д0) исследования 5×10⁶ человеческих миеломных клеток линии NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 50:50 матригеля (BD Biosciences, France), вводили подкожно (п/к) в правый дорсальный бок иммунодефицитных мыш-

ных самок NOD/Shi-scid IL2rgamma(нуль) (NOG) в возрасте 8-10 недель (Taconic, Ry, Danemark). За 24-72 ч до п/к имплантации опухолевых клеток H929 все мыши получали облучение всего тела γ -источником (1,44 Gy, ^{60}Co , BioMer, Бретеньер, Франция). На 15-й день (Д15) мыши NOG получали однократную внутривенную (в/в) инъекцию 2×10^7 человеческих МКПК (в 500 мкл ФСБ 1X pH 7,4). Охарактеризование МКПК человека было выполнено иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Затем мышей внимательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля (n=9/группа) с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Couterpon, Франция) и проводили статистический анализ (дисперсионный анализ) для проверки однородности между группами. Лечение антителами начинали в День 19 (Д19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929, когда объем опухоли достигал по меньшей мере 100-150 мм³ у всех мышей, со средним объемом опухоли 300±161 мм³ для контрольной группы, обработанной носителем, 315±148 мм³ для группы, обработанной 2,6 нМ/кг контрольного ТСВ, 293±135 мм³ для группы 2,6 нМ/кг 83A10-ТСВсv и 307±138 мм³ для группы 2,6 нМ/кг ВСМА50-(scFv)₂ (ВСМА50-BiTE®). Схема лечения антителом ТСВ основывалась на фармакокинетических результатах, ранее полученных с помощью 83A10-ТСВсv, и состояла из в/в введения один раз в неделю в течение вплоть до 3 недель (т.е. всего 3 инъекции антитела ТСВ). Через четыре дня после восполнения мышей-хозяев человеческими МКПК (Д19) вводили первую дозу анти-ВСМА/анти-CD3 83A10-ТСВсv антитела (2,6 нМ/кг, соответственно, 0,5 мг/кг) путем инъекции в хвостовую вену. Образцы крови отбирали путем пункции яремной/нижнечелюстной вены (под анестезией) за 1 ч до каждой обработки, за 2 ч до второй обработки и по окончании у мышей из всех групп, получавших 83A10-ТСВсv и контрольное ТСВсv. Образцы крови немедленно переносили в пробирки, содержащие активатор свертывания (пробирки T MG, вишнево-красный верх, Capiject®, Teguto®). Пробирки оставляли при комнатной температуре на 30 мин, чтобы обеспечить свертывание. Затем пробирки центрифугировали при 1300 g в течение 5 мин для отделения сгустка от сыворотки. Готовили аликвоты сыворотки, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до дополнительного анализа. Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. Процент роста опухоли, обозначенный как РО (%), определяли путем вычисления $\text{РО} (\%) = 100 \times (\text{медианное значение ОО анализируемой группы}) / (\text{медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель})$. По этическим причинам мышей умерщвляли, когда ОО достигал по меньшей мере 2000 мм³. На фиг. 15 показан ОО для каждой отдельной мыши в экспериментальной группе:

- (А) контрольные группы, включающие контроль в виде носителя (цельная линия) и контрольного ТСВ (пунктирная линия),
- (В) группа 83A10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) и
- (С) ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг).

В группе 83A10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) у 6 из 9 мышей (67%) опухоль регрессировала даже ниже ОО, записанного в Д19, то есть первое лечение ТСВ и регрессия опухоли сохранялись до прекращения исследования. Три мыши в группе, обработанной 83A10-ТСВсv (2,6 нМ/кг), которые не продемонстрировали регрессию опухоли, имели ОО, составляющие 376, 402 и 522 мм³ соответственно в Д19. Напротив, ни у одной из 9 мышей (0%), получавших эквивалентную дозу ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) по схеме один раз в неделю в течение 3 недель, не наблюдали регрессии опухоли в какой-либо момент времени. Табл. 25 показывает прогрессирование объемов опухоли с течением времени во всех экспериментальных группах. Процент роста опухоли рассчитывали для Д19-Д43 и сравнивали между группой 83A10-ТСВсv (2,6 нМ/кг) и ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг) (фиг. 16). Результаты демонстрируют что РО (%) постепенно и значительно снижался в группе 83A10-ТСВсv (2,6 нМ/кг), а также РО (%) всегда был ниже по сравнению с ВСМА50-BiTE® (2,6 нМ/кг). В табл. 26 показан медианный объем опухоли (ОО) и процент роста опухоли (РО (%)) в дни с 19 по 43. Общие результаты четко продемонстрировали, что 83A10-ТСВсv превосходит ВСМА50-BiTE® по индукции противоопухолевой активности *in vivo*, когда лечение назначается в эквивалентной дозе один раз в неделю в течение 3 недель.

Таблица 25. Прогрессирование объемов опухоли с течением времени у мышей из контрольной группы носителя и мышей, получавших эквивалентные дозы контрольного ТСВ, 83A10-ТСВсв и ВСМА50-(scFv)₂ (ВСМА50-BiTE®)

Объем опухоли (мм ³)	Группа А с контролем в виде носителя										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	Среднее	СО
День 5	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
День 8	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
День 12	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
День 15	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
День 19	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
День 23	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
День 27	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
День 30	1870	1129	x	419,2	867	1060	1368	673	1331	1090	450
День 34	x	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
День 37		2140		2043	1309	2017	2394	1267	x	1862	464
День 40		x		x	1592	x	x	1346		1469	174
День 43					1548			1994		1771	314
День 47					x			x			
День 51											
Объем опухоли (мм ³)	Группа В 2,6 нМ/кг контрольного ТСВ										
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	Среднее	СО
День 5	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
День 8	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
День 12	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
День 15	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
День 19	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
День 23	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
День 27	924	1252	232	780	768	1009	915	606	630	791	289
День 30	1191	1714	326	867	1230	1349	1118	817	783	1044	398
День 34	1684	x	592	1466	1660	1954	1765	1180	576	1359	529
День 37	2522		597	1735	1105	x	x	1402	861	1370	691
День 40	x		978	2388	1952			2277	1365	1792	604
День 43			1302	x	x			x	1895	1599	419
День 47			2346						2373	2359	19
День 51			x						x		
Объем опухоли (мм ³)	Группа С 2,6 нМ/кг 83A10-ТСВсв										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	Среднее	СО
День 5	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
День 8	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
День 12	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
День 15	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
День 19	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
День 23	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210
День 27	1119	376	443	1400	253	253	678	371	1166	673	441
День 30	1607	187	260	1975	88	113	219	191	1590	692	783
День 34	2143	66	100	x	34	54	63	53	2429	618	1033
День 37	x	41	44		43	34	34	35	x	38	5
День 40		64	40		43	38	32	39		43	11
День 43		40	43		33	24	32	25		33	8
День 47		14	21		16	12	19	14		16	3
День 51		15	30		20	20	15	18		20	6

Объем опухоли (мм ³)	Группа D 2,6 нМ/кг ВСМА50-(scFv) ₂ (ВСМА50-BiTE®)										
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Среднее	СО
День 5	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
День 8	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
День 12	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
День 15	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
День 19	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
День 23	560	483	121	811	665	408	654	457	1115	586	278
День 27	827	879	216	1224	1092	732	886	908	1526	921	359
День 30	1026	1414	227	1476	1373	1256	1210	1228	2433	1294	567
День 34	1368	1855	418	2185	1734	1936	1465	1645	x	1576	535
День 37	1691	2754	599		2542		2102	2062		1958	765
День 40	2764	x	706		x		x	x		1735	1455
День 43	x		807							807	н/д
День 47			x								
День 51											

Таблица 26. Средний объем опухоли (ОО) и процент роста опухоли (РО (%)) в дни 19-43: 83A10-TCBscv по сравнению с ВСМА50-BiTE®

Ингибирование роста опухоли РО _{инг} (%)	Контроль в виде обработки носителем		83A10-TCBscv 2,6 нМ/кг		ВСМА50-BiTE® 2,6 нМ/кг		Контрольное TCB 2,6 нМ/кг	
	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)	Медианное значение ОО	РО (%)
День 19	327	100	287	87,8	303	92,7	285	87,2
День 23	481	100	395	82,1	560	116,4	461	95,8
День 27	870	100	443	50,9	886	101,8	780	89,7
День 30	1094,5	100	219	20,0	1256	114,8	1118	102,1
День 34	1521	100	65,5	4,3	1689,5	111,1	1563	102,8
День 37	2030	100	38	1,9	2082	102,6	1253,5	61,7
День 40	1469	100	39,5	2,7	1735	118,1	1952	132,9
День 43	1771	100	32,5	1,8	807	45,6	1598,5	90,3
День 47	/	/	15	/	/	/	2359,5	/
День 51	/	/	19	/	/	/	/	/

Пример 19. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на плазматические клетки из мононуклеарных клеток периферической крови или аспириатов костного мозга пациента с плазмноклеточным лейкозом (ПКЛ) в присутствии аутологичных Т-лимфоцитов, индуцированных биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии

Плазмноклеточный лейкоз (ПКЛ) представляет собой лейкозный вариант миеломы, возникающей либо de novo, либо из клинически существовавшей множественной миеломы (ММ). Текущие доступные методы лечения довольно ограничены и состоят в основном из комбинаций препаратов для ММ и химиотерапии. До настоящего времени не было зарегистрировано какой-либо терапии для этого чрезвычайно агрессивного и смертельного заболевания. ВСМА играет важную роль в выживании нормальных плазматических клеток, и биспецифические анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела можно использовать для лечения плазмноклеточного лейкоза у пациента, страдающего указанным заболеванием. Свежесобранные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) из образцов пациентов с плазмноклеточным лейкозом, содержащих >80% плазматических клеток при большом количестве лейкоцитов, выделяют с помощью градиента плотности с использованием фиколла или других сопоставимых способов, и инкубируют в течение 24 и 48 ч с концентрациями биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител или контрольных антител от 0,1 пМ до 30 нМ при 37°C в атмосфере увлажненного воздуха. В качестве образцов также могут быть использованы аспириаты цельного костного мозга из пациентов с плазмноклеточным лейкозом. Каждая доза проанализирована в трех повторностях. Апоптоз определяют путем окрашивания аннексином/пропидий йодидом всей популяции и CD138-положительных клеток на FACSCalibur с использованием программного обеспечения Diva (BD). Жизнеспособность плазматических клеток и всей популяции МКПК исследуют с помощью пропидий йодида/двойного окрашивания CD138-FITC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Средние значения нормализованы по средним значениям трех повторностей соответствующего контроля в виде среды (МС). Для статистического анализа используется односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста клеток ПКЛ при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Также измеряют максимальное ингибирование контрольного антитела TCB (10 или 30 нМ) по сравнению с контролем-средой. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Bioconductor 2.1310,

но для расчета значений IMAХ (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Экспрессию ВСМА также измеряли на плазматических клетках CD138⁺ МКПК из образцов пациентов с плазмноклеточным лейкозом, а также определяли соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (Е:Т). Как показано на фиг. 20, результаты четко демонстрируют, что в двух образцах пациентов с плазмноклеточным лейкозом значительно уменьшилось количество жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза в костном мозге с помощью 42-ТСВсv (то есть увеличился лизис клеток плазмноклеточного лейкоза в костном мозге) по сравнению с контролем-средой. Табл. 27 демонстрирует процент максимального ингибирования клеток плазмноклеточного лейкоза из аспириатов костного мозга пациента или периферической крови, индуцированного 10 нМ (IMAX10) и 1 нМ (IMAX1) биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител относительно контроля-среды. Результаты демонстрируют, что 42-ТСВсv является очень эффективным средством для индукции гибели клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга пациента. Несмотря на специфический лизис клеток плазмноклеточного лейкоза костного мозга, индуцированный биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, и исследованных образцов костного мозга (пациент 1 ПКЛ), микросреда костного мозга (ВММЕ) не была затронута в соответствующих образцах (данные не показано). Уничтожение с помощью EM901 злокачественных плазматических клеток у пациентов с ПКЛ является эффективным. Но по меньшей мере в одном из двух образцов пациентов, исследованных при самой высокой концентрации 10 нМ, уничтожение составляло только немного выше 50%. Эксперименты с комбинациями EM901 либо с талидомидами, либо с антителами PD-1 или PD-L1, либо с анти-CD38 антителами покажут потенциальную пользу таких комбинаций, например, как более высокий процент (%) уничтожения, например, с 10 нМ или другими концентрациями EM901.

Таблица 27. Значения IMAХ10 и IMAХ1 в отношении максимального ингибирования роста клеток плазмноклеточного лейкоза при 10 нМ IMAХ10 и ингибирования при 1 нМ IMAХ1, исходя из количества пропидий йодид-отрицательных жизнеспособных клеток плазмноклеточного лейкоза из аспириатов костного мозга пациентов в присутствии биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител

Образец пациента №	42-ТСВсv		Контр. ТСВ
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	99,6	88,2	-2,7
2	~60,0	~40,0	~8,0

Пример 20. Перенаправленная цитотоксичность Т-лимфоцитов на плазматические клетки костного мозга пациентов с первичным амилоидозом (амилоидоз AL - амилоидоз с легкоцепочечным амилоидом) в присутствии аутологичных Т-лимфоцитов, индуцированных биспецифическими анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антителами, по данным проточной цитометрии

Первичный амилоидоз является редким заболеванием, вызванным нарушением костного мозга, которое обычно поражает людей в возрасте 50-80 лет, причем две трети пациентов являются мужчинами. Первичный амилоидоз выражается в аномальном продуцировании белка антител/иммуноглобулинов плазматическими клетками. При первичном амилоидозе легкие цепи (LC) антитела неправильно свернуты, и в результате чего аномальный LC неправильно свернутый белок формирует амилоид. Эти неправильно свернутые амилоидные белки откладываются в тканях, нервах и органах или возле них. Поскольку амилоид накапливается в органе, нерве или ткани, он постепенно наносит ущерб и влияет на их функцию. У пациентов с первичным амилоидозом часто поражаются больше чем одним орган. Поскольку ВСМА играет существенную роль в выживании нормальных плазматических клеток, является весьма обоснованной оценка влияние биспецифических анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антител на уничтожение плазматических клеток при первичном амилоидозе. Свежеотобранные образцы/аспириаты цельного костного мозга пациентов с первичным амилоидозом либо прямо подвергали воздействию анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антител, либо окрашивали магнитными микрогранулами CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия), пропускали через колонку для разделения клеток autoMACS, и собранные фракции с достаточным оставшимся количеством плазматических клеток первичного амилоидоза, составляющим обычно >4%, использовали в дополнительных экспериментах. В 24-луночных плашках, 500000 клеток/лунка инкубировали и культивировали в течение 48 ч. Разведения анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ антител и контрольного антитела добавляли в соответствующие лунки до конечной концентрации ТСВ от 0,1 пМ до 30 нМ. Каждая доза проанализирована в трех повторностях. Жизнеспособность плазматических клеток и клеток микроокружения костного мозга исследовали с помощью двойного окрашивания пропидий йодидом/CD138-PIТC с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur; Becton Dickinson). Анализ данных выполняют с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Кроме того, комбинации EM901 с талидомидами, или анти-PD-1 антителами, или анти-PD-L1 антителами, или анти-CD38 антителами тестировали в тех же экспериментальных условиях. Испытывали различные концентрации EM901, а также партнеров по комбинации. Средние значения нормализованы по средним значениям трех повторностей соответствующего контроля в виде среды (МС). Для статисти-

ческого анализа используется односторонний критерий Стьюдента. Максимальное ингибирование роста клеток ПКЛ при концентрации 10 нМ (IMAX10) и ингибирование, измеренное при 1 нМ (IMAX1), соответственно, даны в процентах, как указано по отношению к контролю-среде. Также измеряют максимальное ингибирование контрольного антитела ТСВ (10 или 30 нМ) по сравнению с контролем-средой. Те же значения также определяются из результатов, полученных для комбинаций, например, максимальное ингибирование, например, 10 нМ EM9091 в присутствии х нМ, например, леналидомида и т.д. Расчеты проводились с использованием R 3.1.19 и Bioconductor 2.1310, но для расчета значений IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Эффект считался статистически значимым, если значение Р его соответствующего статистического теста составляло <5% (*), <1% (**) или <0,1% (***). Экспрессию ВСМА также измеряли на CD138⁺ плазматических клетках костного мозга из образцов пациентов с первичным амилоидозом, а также определяли соотношение эффекторных клеток к опухолевым клеткам (Е:Т).

Пример 21. Комбинированное применение биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела с иммунотерапевтическим лекарственным средством

Биспецифическое анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитело (а именно, 83A10-ТСВсв или 42-ТСВсв) комбинировали с тремя лекарственными средствами, представляющими различные виды иммуноterapiи: леналидомидом, анти-PD-1 антителом и анти-CD38 антителом даратумумабом. Клетки H929 MM совместно культивировали с лейкоцитами человека из здоровых доноров (n=1 или 5) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС, 0,5% гентамицина и 1% L-глутамин при 37°C в увлажненном 5%-ном CO₂-инкубаторе, и подвергали воздействию субоптимальных концентраций 83A10-ТСВсв (10 пМ) (n=5) или 42-ТСВсв (10 пМ) (n=1) отдельно или в комбинации с леналидомидом (1 мкМ), анти-PD-1 антителом (10) мкг/мл и анти-CD38 антителом даратумумабом (10 мкг/мл). Как показано на фиг. 21А, комбинирование 83A10-ТСВсв с леналидомидом или даратумумабом значительно увеличивало их анти-MM эффективность в 4 и 2,5 раза соответственно. На фиг. 21В и в табл. 28 показан процент лизиса клеток MM, когда клетки H929 и лейкоциты из одного здорового донора подвергались воздействию 42-ТСВсв (10 пМ) в комбинации с леналидомидом (1 мкМ), анти-PD-1 антителом (10 мкг/мл) и анти-CD38 антителом даратумумабом (10 мкг/мл) в течение 48 ч культивирования. Комбинирование 42-ТСВсв с леналидомидом или даратумумабом также увеличивало их анти-MM эффективность в уничтожении клеточных линий MM.

Таблица 28. Лизис клеток MM с анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ отдельно или в комбинации с леналидомидом, анти-PD-1 антителом или анти-CD38 антителом даратумумабом: пример с донором 1

	Донор 1	
	без ТСВ	с ТСВ
Только 42-ТСВсв (10 пМ)	6,74%	
Комбинация с 42-ТСВсв:		
Даратумумаб (10 мкг/мл)	33,06%	42,29%
леналидомид (1 мкМ)	-1,78%	13,27%
Анти-PD-1	20,26%	23,56%

Пример 22. Комбинированное применение *in vivo* биспецифического анти-ВСМА/анти-CD3 Т-лимфоцитов антитела с анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом

Аддитивную или синергетическую комбинацию анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ с антителом, чтобы заблокировать путь PD-1/PD-L1 (либо с анти-PD-1 антителом, либо с анти-PD-L1 антителом) и ингибировать нисходящую модуляцию ответов Т-лимфоцитов при взаимодействии PD-L1 с его рецептором PD-1 на Т-лимфоцитах, можно оптимально наблюдать в условиях *in vivo*, таких как модель ксенотранспланта MM или мышьяная модель MM, вместо наблюдения *in vitro*. Вкратце, в День 0 (D0) исследования 5×10⁶ человеческих миеломных клеток линии NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 50:50 матригеля (BD Biosciences, Франция), вводили подкожно (п/к) в правый дорсальный бок иммунодефицитных мышьяных самок NOD/Shi-scid IL2gamma(нуль) (NOG) в возрасте 8-10 недель (Taconic, Ry, Дания). На 15-й день (D15) мыши NOG получали однократную внутривенную (в/в) инъекцию 2×10⁷ человеческих МКПК (в 500 мкл ФБС 1X pH 7,4). Охарактеризование МКПК человека было выполнено иммунофенотипированием (проточная цитометрия). Мышей затем тщательно рандомизировали в различные группы лечения и контроля (n=9/группа) и проводили статистический анализ (дисперсионный анализ) для проверки однородности между группами. Лечение антителами начинали в День 19 (D19), то есть через 19 дней после п/к инъекции опухолевых клеток H929, когда объем опухоли достигал по меньшей мере 100-150 мм³ у всех мышей. Схема лечения антителом ТСВ основывалась на фармакокинетических результатах, ранее полученных с помощью анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ, и состояла из в/в введения один раз в неделю в течение вплоть до 3 недель (т.е. всего 3 инъекции антитела ТСВ). Через два-четыре дня после восполнения мышьяных хозяев человеческими МКПК (D19) вводили первую еженедельную дозу только анти-ВСМА/анти-CD3 антитела (доза от 0,1 до 0,5 мг/кг) путем инъекции в хвостовую вену, или в комбинации с анти-PD-L1 антителом, также вводимым один раз в неделю (доза от 1 до 10 мг/кг). Объем опухоли (ОО) измеряли штангенциркулем во время исследования, а прогресс оценивали путем межгруппового сравнения ОО. Процент роста опухоли,

обозначенный как PO (%), определяли путем вычисления $PO (\%) = 100 \times (\text{медианное значение ОО анализируемой группы}) / (\text{медианное значение ОО контрольной группы, получавшей носитель})$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение биспецифического антитела для лечения множественной миеломы в комбинации с иммунотерапевтическим лекарственным средством, где биспецифическое антитело содержит первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), причем указанная первая связывающая часть содержит:

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

б) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 23; область CDR2L SEQ ID NO: 24 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

в) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 25; область CDR2L SEQ ID NO: 26 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; или

г) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 15, область CDR2H SEQ ID NO: 16 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 18; область CDR2L SEQ ID NO: 19 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

где иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из талидомида или его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-антитела и анти-PD-L1-антитела.

2. Применение биспецифического антитела по п.1, где иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, изатаксимаб (SAR650984), MOR202, анти-CD38 антитело Ab79 (Takeda), анти-CD38 антитело Ab19 (Takeda), талидомид (2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-дион), леналидомид, помалидомид, CC-122 (2,6-пиперидиндион,3-(5-амино-2-метил-4-оксо-3(4H-хиназолинил), гидроклорид (1:1)), CC220 (2,6-пиперидиндион,3-[1,3-дигидро-4-[[4-(4-морфолинилметил)фенил]метокси]-1-оксо-2H-изоиндол-2-ил]-, (3S)-, гидроклорид (1:1)), пембролизумаб, пидилизумаб (CT-011, hBAT или hBAT-1), ниволумаб (BMS-936558, MDX 1106), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаб (MPDL3280A), авелумаб (MSB001071 8C), дурвалумаб (MEDI4736) или MDX-1105 (BMS-936559).

3. Способ лечения множественной миеломы, где способ лечения включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, комбинации терапевтически эффективного количества биспецифического антитела и иммунотерапевтического лекарственного средства, причем:

а) биспецифическое антитело содержит первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), где первая связывающая часть содержит:

(i) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 27; область CDR2L SEQ ID NO: 28 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(ii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 23; область CDR2L SEQ ID NO: 24 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(iii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 25; область CDR2L SEQ ID NO: 26 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; или

(iv) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 15, область CDR2H SEQ ID NO: 16 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 18; область CDR2L SEQ ID NO: 19 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; и

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из талидомида или его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела.

4. Способ по п.3, где иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, изатаксимаб, MOR202, анти-CD38 антитело Ab79, анти-CD38 антитело Ab19, талидомид, леналидомид, помалидомид, CC-122, CC-220, пембролизумаб, пидилизумаб, ниволумаб, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или MDX-1105.

5. Терапевтическая комбинация для достижения лизиса клеток множественной миеломы у пациента, страдающего от заболевания множественной миеломы, причем комбинация содержит терапевтически эффективное количество:

а) биспецифического антитела, содержащего первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания человека (BCMA), и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), причем первая связывающая часть содержит:

(i) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 27; область CDR2L SEQ ID NO: 28 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(ii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 23; область CDR2L SEQ ID NO: 24 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(iii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 25; область CDR2L SEQ ID NO: 26 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; или

(iv) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 15, область CDR2H SEQ ID NO: 16 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 18; область CDR2L SEQ ID NO: 19 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; и

б) иммунотерапевтического лекарственного средства, выбранного из группы, состоящей из талидомида или его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела.

6. Терапевтическая комбинация по п.5, причем иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, изатаксимаб, MOR202, анти-CD38 антитело Ab79, анти-CD38 антитело Ab19, талидомид, леналидомид, помалидомид, CC-122, CC-220, пембролизумаб, пидилизумаб, ниволумаб, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или MDX-1105.

7. Набор для лечения множественной миеломы, содержащий:

а) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) человека, и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), причем первая связывающая часть содержит:

(i) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 27; область CDR2L SEQ ID NO: 28 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(ii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 23; область CDR2L SEQ ID NO: 24 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(iii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 25; область CDR2L SEQ ID NO: 26 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; или

(iv) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 15, область CDR2H SEQ ID NO: 16 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 18; область CDR2L SEQ ID NO: 19 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

б) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида или его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела;

в) фармацевтически приемлемый носитель и

д) инструкции для введения указанного биспецифического антитела и указанного иммунотерапевтического лекарственного средства в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении множественной миеломы.

8. Набор по п.7, отличающийся тем, что иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, изатаксимаб, MOR202, анти-CD38 антитело Ab79, анти-CD38 антитело Ab19, талидомид, леналидомид, помалидомид, CC-122, CC-220, пембролизумаб, пидилизумаб, ниволумаб, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или MDX-1105.

9. Способ изготовления лекарственного средства, включающего:

а) биспецифическое антитело, содержащее первую связывающую часть, специфически связывающуюся с В-клеточным антигеном созревания (BCMA) человека, и вторую связывающую часть, специфически связывающуюся с CD3ε человека (CD3), причем первая связывающая часть содержит:

(i) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 27; область CDR2L SEQ ID NO: 28 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(ii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 23; область CDR2L SEQ ID NO: 24 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

(iii) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 21, область CDR2H SEQ ID NO: 22 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 25; область CDR2L SEQ ID NO: 26 и область CDR3L SEQ ID NO: 20; или

(iv) область VH, содержащую область CDR1H SEQ ID NO: 15, область CDR2H SEQ ID NO: 16 и область CDR3H SEQ ID NO: 17, и область VL, содержащую область CDR1L SEQ ID NO: 18; область CDR2L SEQ ID NO: 19 и область CDR3L SEQ ID NO: 20;

b) иммунотерапевтическое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из талидомида или его иммунотерапевтического производного, анти-CD38 антитела, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела,

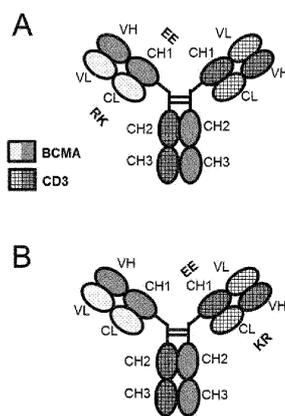
причем способ включает объединение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела и терапевтически эффективного количества иммунотерапевтического лекарственного средства в фармацевтически приемлемом носителе.

10. Способ изготовления лекарственного средства по п.9, где иммунотерапевтическое лекарственное средство представляет собой даратумумаб, изатаксимаб, MOR202, анти-CD38 антитело Ab79, анти-CD38 антитело Ab19, талидомид, леналидомид, помалидомид, CC-122, CC-220, пембролизумаб, пидилизумаб, ниволумаб, MEDI-0680, PDR001, REGN2810, BGB-108, h409A11, h409A16, h409A17, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или MDX-1105.

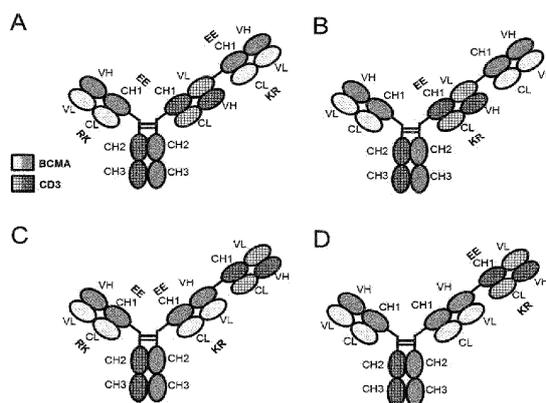
11. Применение биспецифического антитела по п.1 или 2, где указанное биспецифическое антитело вводят подкожно.

12. Способ по п.3 или 4, где указанное биспецифическое антитело вводят подкожно.

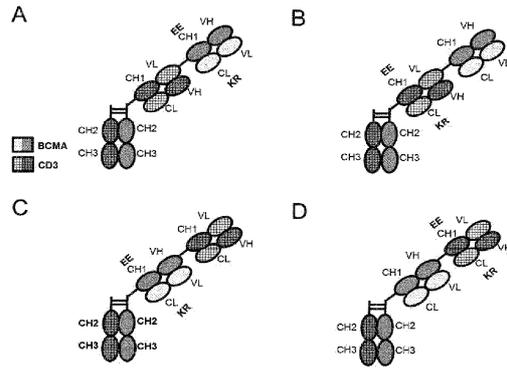
13. Набор по п.7 или 8, где указанное биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело для подкожного введения.



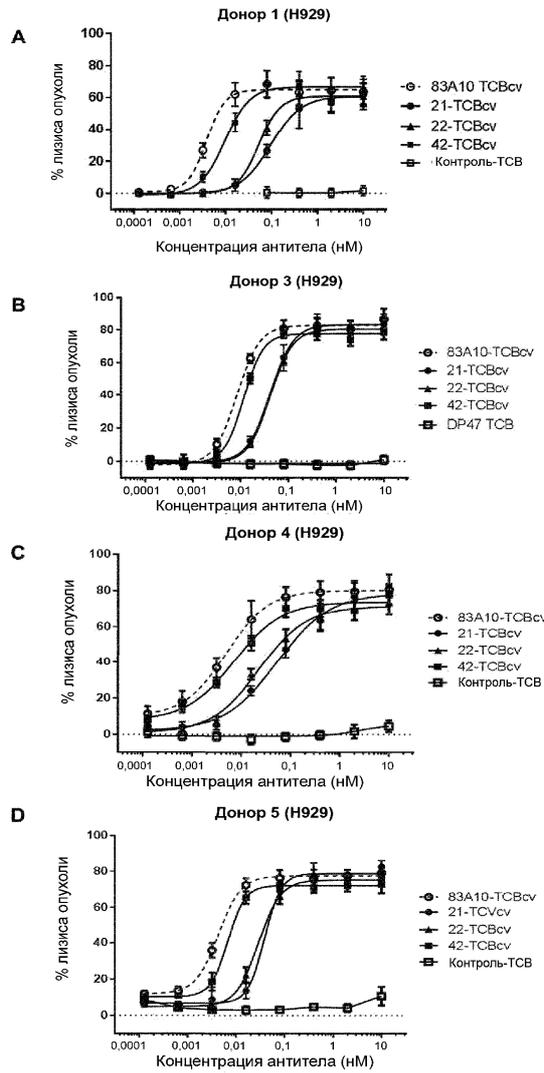
Фиг. 1



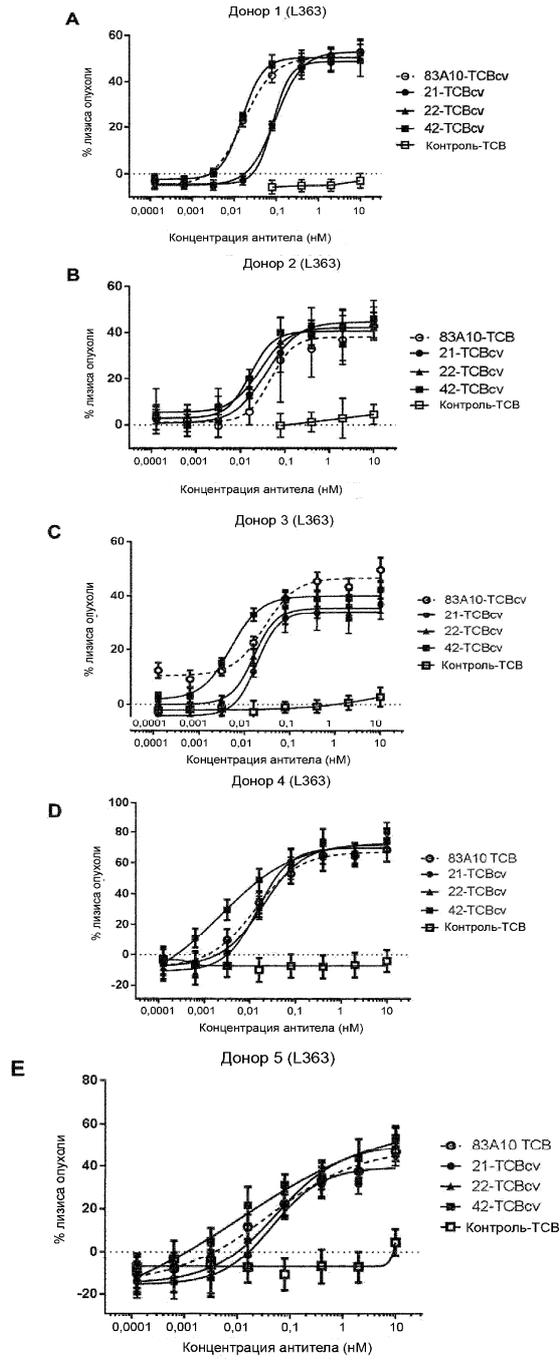
Фиг. 2



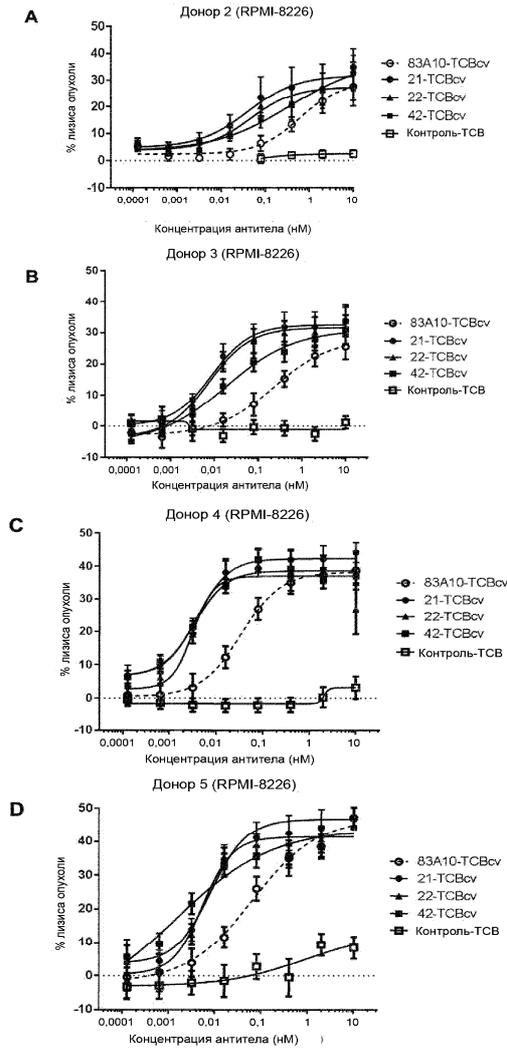
Фиг. 3



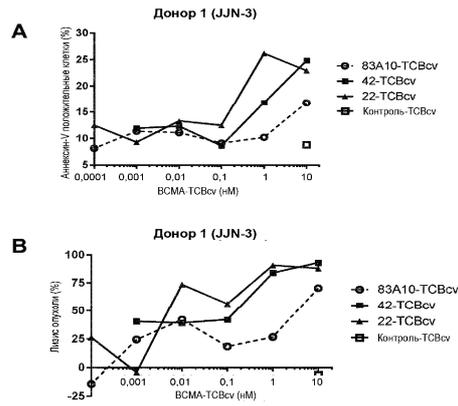
Фиг. 4

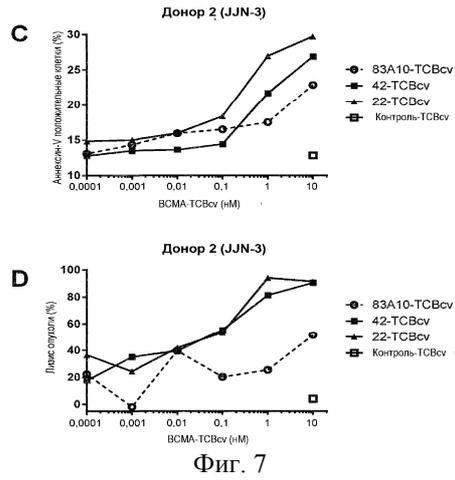


Фиг. 5

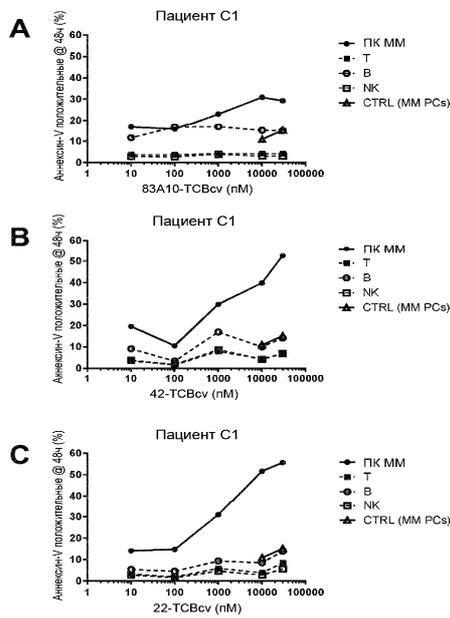


Фиг. 6

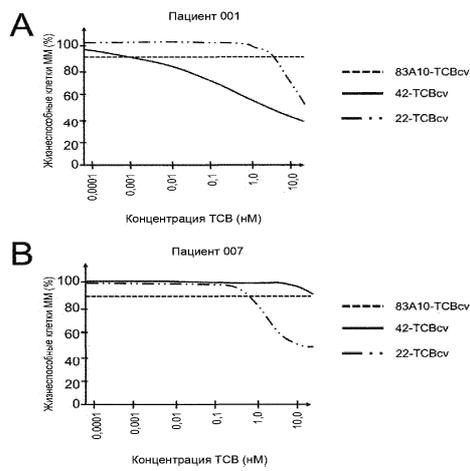




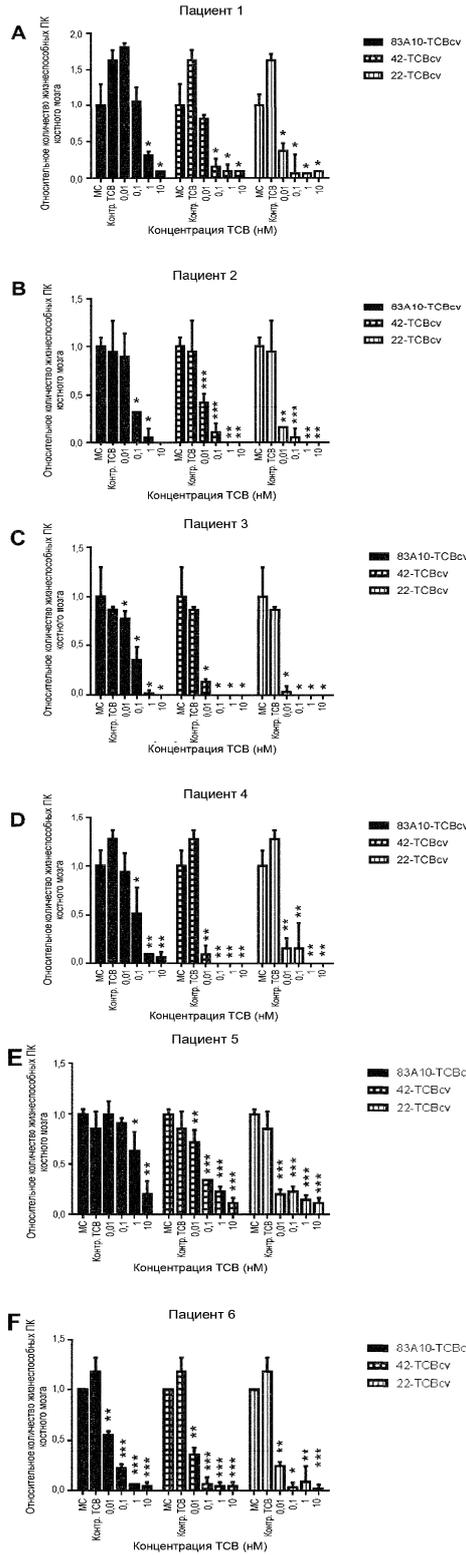
Фиг. 7

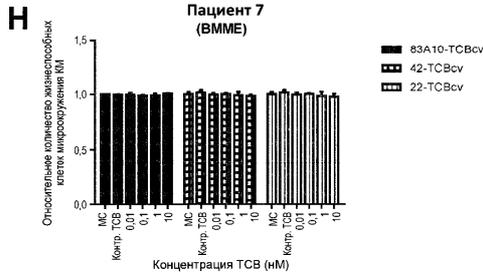
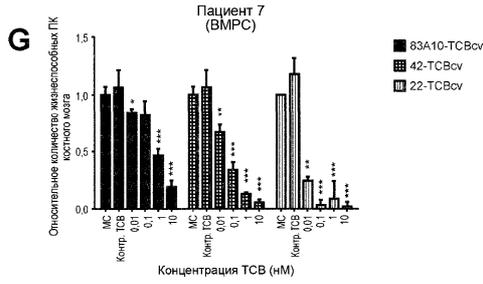


Фиг. 8

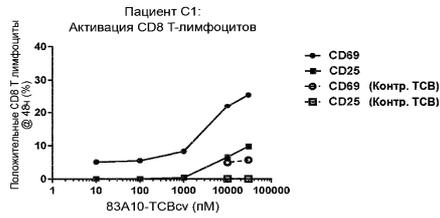
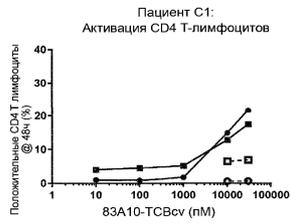


Фиг. 9

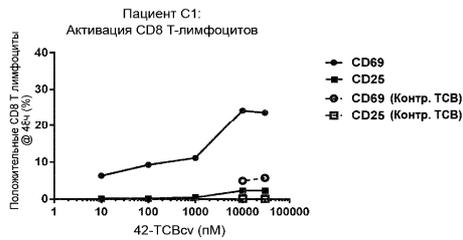
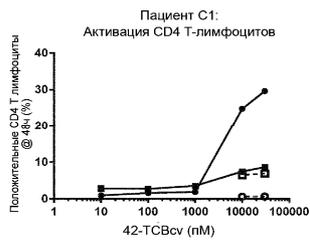




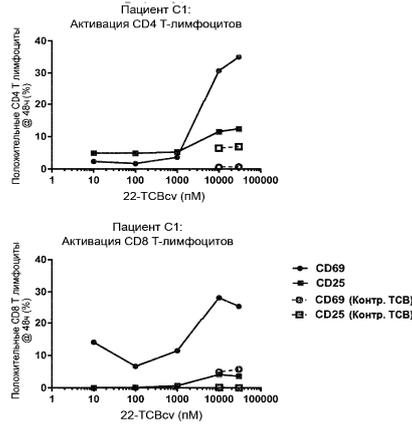
Фиг. 10



Фиг. 11А

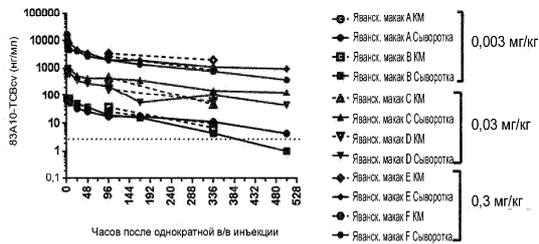


Фиг. 11В

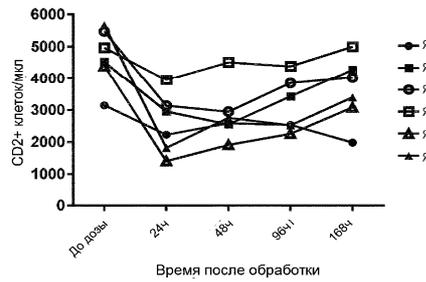


Фиг. 11С

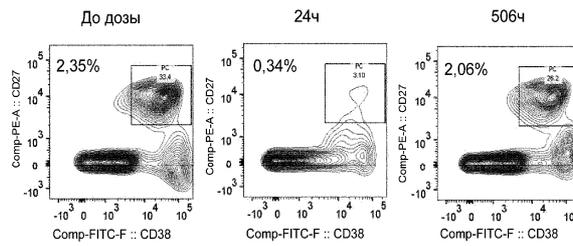
Концентрации 83A10-TCVcv у яванского макака после однократной в/в инъекции



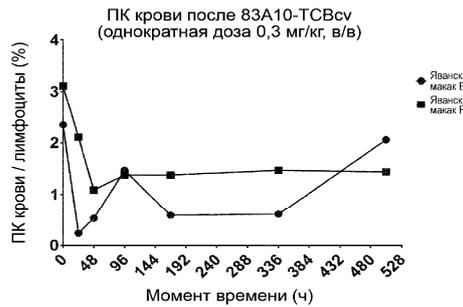
Т-лимфоциты крови



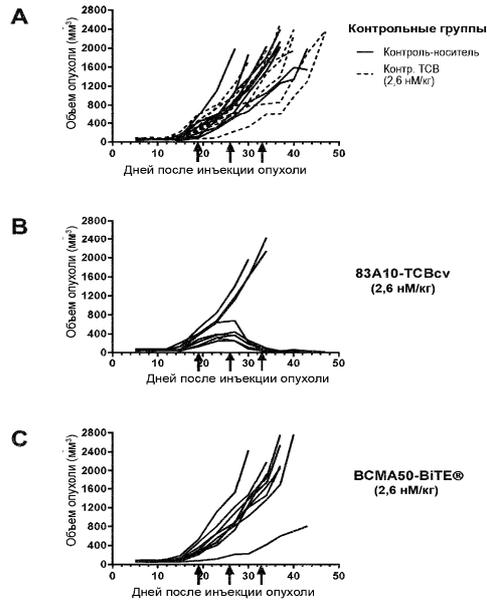
Фиг. 13



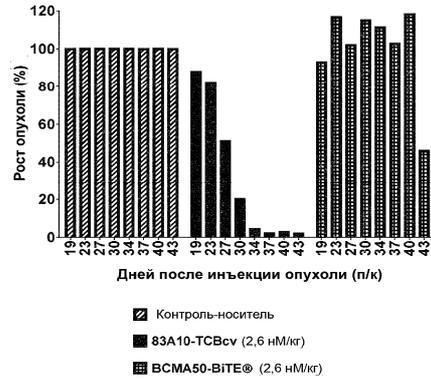
Фиг. 14А



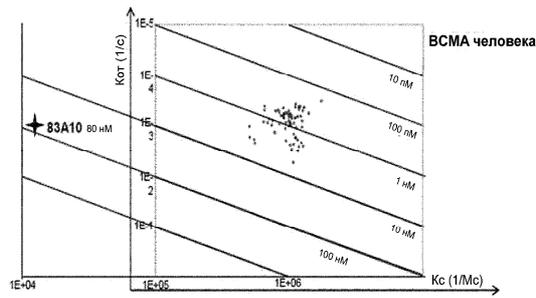
Фиг. 14В



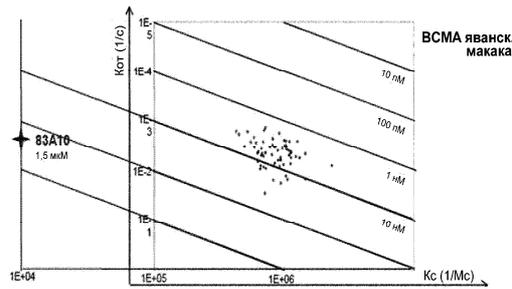
Фиг. 15



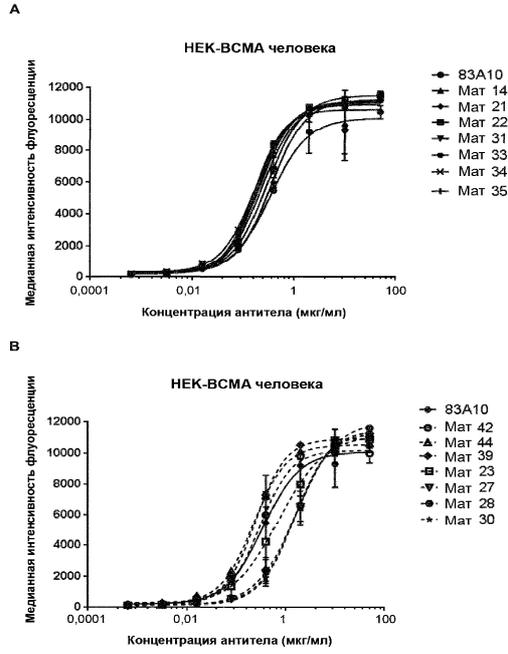
Фиг. 16



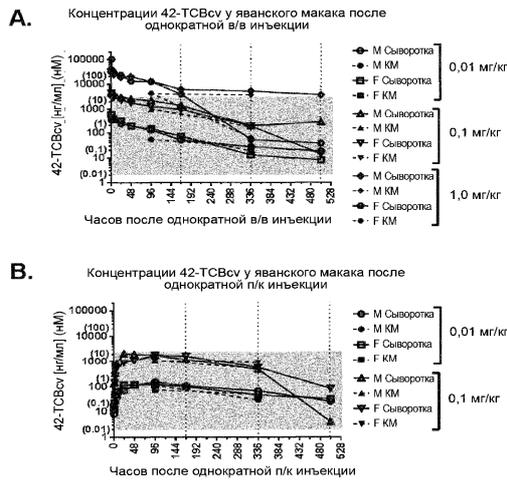
Фиг. 17А



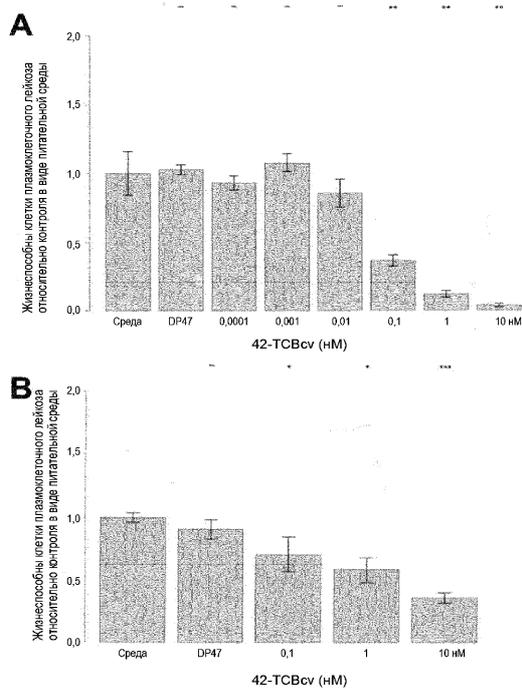
Фиг. 17В



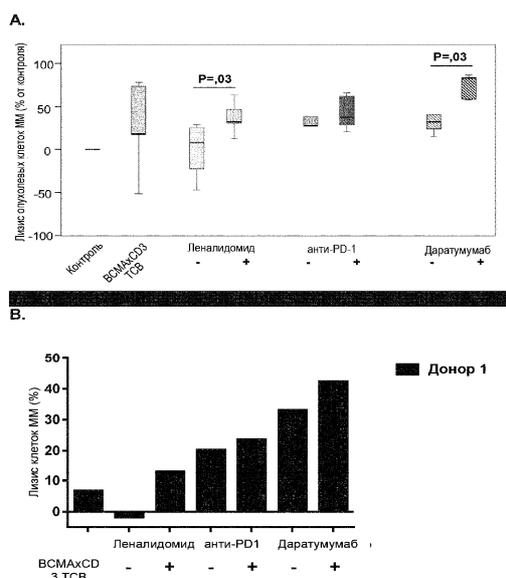
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21