

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045730**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |   |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2023.12.20</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>201990784</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2017.09.22</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <b>C07K 16/30</b> (2006.01)<br/><b>A61K 39/395</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/44</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/28</b> (2006.01)<br/><b>C07K 16/46</b> (2006.01)</p> |
|---|---|

**(54) АНТИ-MUC16 (MUCIN16) АНТИТЕЛА**

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| <p>(31) <b>62/399,249; 62/558,711</b></p> <p>(32) <b>2016.09.23; 2017.09.14</b></p> <p>(33) <b>US</b></p> <p>(43) <b>2019.09.30</b></p> <p>(86) <b>PCT/US2017/053114</b></p> <p>(87) <b>WO 2018/058003 2018.03.29</b></p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>РИДЖЕНЕРОН<br/>ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Абер Лорик, Смит Эрик, Келли<br/>Маркус, Киршнер Джессика Р., Коэтзи<br/>Сандра, Кроуфорд Элисон, Ниттоли<br/>Томас, Лю Яшу (US)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Медведев В.Н. (RU)</b></p> | <p>(56) <b>WO-A1-2016149368</b></p> |
|---|-------------------------------------|

- (57) В изобретении муцин 16 (MUC16) экспрессируется на высоком уровне при раке яичников, и показано, что экспрессия на раковых клетках защищает опухолевые клетки от иммунной системы. Изобретение относится к новым полноразмерным человеческим антителам IgG, которые связываются с MUC16 человека (моноспецифические антитела). Изобретение также относится к новым биспецифичным антителам (бсАт), которые связываются как с MUC16, так и с CD3 и активируют Т-клетки через CD3 комплекс в присутствии опухолей, экспрессирующих MUC16. Согласно определенным вариантам осуществления изобретение относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и обезьяны, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает MUC16 человека и обезьяны. В определенных вариантах осуществления изобретения указанные биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих MUC16. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по изобретению полезны для лечения заболеваний и расстройств, при которых усиленный или индуцированный MUC16-направленный иммунный ответ является желательным и/или терапевтически полезным. Например, биспецифичные антитела по изобретению полезны для лечения различных видов рака, включая рак яичников. Изобретение также включает конъюгаты анти-MUC16 антитела с лекарственным средством, которые ингибируют рост опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные анти-MUC16 антитела полезны в диагностических способах для выявления присутствия MUC16 в образцах ткани и/или плазмы.

**045730**  
**B1**

**045730**  
**B1**

### Ссылка на список последовательностей

Данная заявка включает в себя в виде ссылки список последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10295WO02-Sequence.txt, созданного 22 сентября 2017 г. и содержащего 893983 байта.1

### Область техники

Данное изобретение относится к антителам, и их антигенсвязывающим фрагментам, которые являются специфичными к муцину 16 (MUC16), и к способам их применения. Данное изобретение также относится к биспецифичным антигенсвязывающим молекулам, которые связывают MUC16 и CD3, и способам их применения. Данное изобретение также относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим анти-MUC16 антитело или его фрагмент и терапевтический агент (например, цитотоксический агент).

### Уровень техники

Муцин 16 (MUC16), также известный как раковый антиген 125, карциномный антиген 125, углеводный антиген 125 или CA-125, представляет собой сильно гликозилированный интегральный мембранный гликопротеин с одним трансмембранным доменом, который экспрессируется на высоком уровне при раке яичников. MUC16 состоит из трех основных доменов: внеклеточного N-концевого домена, большого домена тандемных повторов, который прерывается доменами белка спермы морского ежа, энтерокиназы, и агрина (SEA), и карбоксильного концевого домена, который содержит сегмент трансмембранного участка и короткий цитоплазматический хвост. Протеолитическое расщепление приводит к отходу большей части внеклеточного участка MUC16 в кровотоке. MUC16 сверхэкспрессируется при раке, включая рак яичников, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутривенечную холангиокарциному массобразующего типа, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта, а также при заболеваниях и состояниях, в том числе воспалительных заболеваниях кишечника, циррозе печени, сердечной недостаточности, инфекции брюшины и абдоминальной хирургии. (Haridas, D. et al., 2014, FASEB J., 28: 4183-4199). Показано, что экспрессия на раковых клетках защищает опухолевые клетки от иммунной системы. (Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13: 129). Были исследованы способы лечения рака яичников с использованием антител к MUC16. Ореговомаб и абговомаб являются анти-MUC16 антителами, которые имеют ограниченный успех. (Felder, выше, Das, S. and Batra, SK 2015, Cancer Res. 75: 4660-4674.)

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессированный на Т-клетках в сочетании с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR), и требуется для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется из димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эпсилон, зета, дельта и гамма. Димерные схемы CD3 включают гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета. Было показано, что антитела против CD3 кластеризуют CD3 на Т-клетках, вызывая тем самым активацию Т-клеток способом, сходным с вовлечением TCR молекулами МНС, нагруженными пептидом. Таким образом, анти-CD3 антитела были предложены для терапевтических целей, включающих активацию Т-клеток. Кроме того, биспецифичные антитела, которые способны связывать CD3 и антиген-мишень, были предложены для терапевтического применения, включающего нацеливание иммунных ответов Т-клеток на ткани и клетки, экспрессирующие антиген-мишень.

Антигенсвязывающие молекулы, которые нацелены на MUC16, в том числе конъюгаты антитело-лекарственное средство, а также биспецифичные антиген-связывающие молекулы, которые связываются как с MUC16, так и с CD3, будут полезны в терапевтических условиях, в которых специфическое нацеливание и Т-клеточное уничтожение клеток, которые экспрессируют MUC16, является желательным.

### Краткое описание сущности изобретения

В первом аспекте, данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с человеческим MUC16. Антитела согласно этому аспекту изобретения полезны, в частности, для нацеливания на клетки, экспрессирующие MUC16. Данное изобретение также относится к биспецифичным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают MUC16 человека и CD3 человека. Биспецифичные антитела в соответствии с этим аспектом изобретения полезны, в частности, для нацеливания Т-клеток, экспрессирующих CD3, и для стимуляции активации Т-клеток, например, в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих MUC16, является полезным или желательным. Например, биспецифичные антитела могут направлять CD3-опосредованную активацию Т-клеток на специфические MUC16-экспрессирующие клетки, такие как опухолевые клетки яичника.

Иллюстративные анти-MUC16 антитела по данному изобретению перечислены в табл. 1 и 2 данного документа. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR) и переменных участков легкой цепи (LCVR), а также участков, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и участков, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типовых анти-MUC16 антител. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типовых анти-MUC16 антител.

Данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим



В сходном варианте реализации данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (то есть HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в парной аминокислотной последовательности HCVR/LCVR, как определено любым из типовых анти-MUC16 антител, перечисленных в табл. 1. Например, данное изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, последовательности SEQ ID NO: 18/26 (например, H1H8767P). Способы и технологии идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Типовые соглашения, которые могут быть применены для определения границ CDR, включают, например, определение по Кабату, определение по Чотии и определение АтМ. В общем случае определение по Кабату основано на вариабельности последовательности, определение по Чотии основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение по АтМ является компромиссом между подходами по Кабату и Чотии; см., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:921-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9212 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-MUC16 антитела или их части. Например, данное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, при этом HCVR содержит набор из трех CDR (то есть HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любыми типовыми анти-MUC16 антителами, перечисленными в табл. 1.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, при этом LCVR содержит набор из трех CDR (то есть LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любыми типовыми анти-MUC16 антителами, перечисленными в табл. 1.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах реализации данного изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых вариантах реализации данного изобретения в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом HCVR и LCVR оба получены из того же анти-MUC16 антитела, указанного в табл. 1.

Данное изобретение также относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным к экспрессии полипептида, содержащего вариабельный участок тяжелой или легкой цепи анти-MUC16 антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, то есть молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. Также в объем данного изобретения включены клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и восстановление антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

Данное изобретение включает анти-MUC16 антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах реализации данного изобретения модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна или антитело, лишенное фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть сделана с целью изменения комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфически связывает MUC16 и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте данное изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-MUC16 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте реализации данного изобретения вторым терапевтическим агентом является любой агент, который преимущественно соединяется с анти-MUC16 антителом. Дополнительные комбинированные терапии и комбинированные составы, включающие анти-MUC16 антитела по данному изобретению, описаны в данном документе в другом месте.

В другом аспекте данное изобретение относится к терапевтическим способам для нацеливания на/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16 с использованием анти-MUC16 антитела по данному изобретению, в котором терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-MUC16 антитело по данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых случаях анти-MUC16 антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) могут быть использованы для лечения рака (например, рака яичников) или могут быть модифицированы для придания им большей цитотоксичности способами, включая, но не ограничиваясь ими, модифицированные Fc-домены чтобы увеличить АЗКЦ (см., например, Shield et al. (2002) JBC 277: 26733), радиоиммунотерапию, конъюгаты антитело-лекарственное средство или другие способы повышения эффективности абляции опухоли.

Данное изобретение также включает использование анти-MUC16 антитела по данному изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства (например, рака), связанных с MUC16-экспрессирующими клетками, или вызванных ими. В одном аспекте данное изобретение относится к соединению, содержащему анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичному антителу MUC16хCD3, как описано в данном документе, для применения в медицине. В другом аспекте данное изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как описано в данном документе, для применения в медицине.

В еще одном аспекте, данное изобретение относится к моноспецифическим анти-MUC16 антителам для диагностических применений, таким как, например, реагенты для визуализации.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к терапевтическим способам стимуляции активации Т-клеток с использованием анти-CD3 антитела или антигенсвязывающей части антитела по данному изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело.

В другом аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывает человеческий муцин 16 (MUC16) с константой равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем около 53 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В еще одном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывает человеческий MUC16 с периодом диссоциативного полураспада ( $t^{1/2}$ ), большим чем около 15 минут, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Данное изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который конкурирует за связывание с MUC16 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте данное изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который конкурирует за связывание с MUC16 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138; 146/154; 162/170; 178/186; 194/394; 202/210; 218/226; 234/242; 250/1936; 258/266; 274/1936; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

Кроме того, изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на MUC16 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на MUC16 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138; 146/154; 162/170; 178/186; 194/394; 202/210; 218/226; 234/242; 250/1936; 258/266; 274/1936; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

Данное изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает MUC16 человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: определяющие комплементарность участки (CDR) вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), имеющего аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1; и CDR вариабельного участка легкой цепи (LCVR), имеющего аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1. В другом аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138; 146/154; 162/170; 178/186; 194/394; 202/210; 218/226; 234/242; 250/1936; 258/266; 274/1936; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386. В еще одном аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-12 6-128; 132-134-13 6-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-396-398-400; 204-206-208-212-214-216; 220-222-224-228-230-232; 236-238-240-244-246-248; 252-254-256-1938-1940-1942; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-1938-1940-1942; 284-286-288-292-294-296; 300-302-304-308-310-312; 316-318-320-324-326-328; 332-334-336-340-342-344; 348-350-352-356-358-360; 364-366-368-372-374-376; и 380-382-384-388-390-392.

В другом аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает MUC16 человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 202, 218, 234, 250, 258, 274, 282, 298, 314, 330, 346, 362 и 378; и (б) вариабельный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10; 26; 42; 58; 74; 90; 106; 122; 138; 154; 170; 186; 210; 226; 242; 266; 290; 306; 322; 338; 354; 370; 386; 1936 и 394. В дополнительном аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий

фрагмент по п.10, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138; 146/154; 162/170; 178/186; 194/394; 202/210; 218/226; 234/242; 250/1936; 258/266; 274/1936; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370 и 378/386.

Данное изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с MUC16 человека в эпителии в диапазоне от остатка 428 до остатка 481 SEQ ID NO: 1902. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 428-434, 429-434, 453-467, 459-467, 460-467 и/или 474-481 SEQ ID NO: 1902. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 428-434, 429-434, 453-467, 459-467, 460-467 и 474-481 SEQ ID NO: 1902. Данное изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с MUC16 человека в эпителии в диапазоне от остатка 126 до остатка 138 SEQ ID NO: 1902. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 126-131, 127-131 и/или 132-138 SEQ ID NO: 1902. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 126-131, 127-131 и 132-138 SEQ ID NO: 1902. Данное изобретение, кроме того, относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с MUC16 человека в эпителии в диапазоне от остатка 357 до остатка 369 SEQ ID NO: 1902. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 357-369, 358-366, 358-369 и/или 361-369 SEQ ID NO: 1902. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотными остатками 357-369, 358-366, 358-369 и 361-369 SEQ ID NO: 1902. Данное изобретение, кроме того, относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с MUC16 человека в одном или более из пяти мембранно-проксимальных доменов SEA MUC 16 человека (SEQ ID NO: 1899). Пять мембранно-проксимальных доменов SEA соответствуют остаткам 13791-14451 SEQ ID NO: 1899. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с  $K_D$  менее чем около 60 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в остатках с 14237 по 14290 SEQ ID NO: 1899. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR пары HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18/26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в остатках с 13935 по 13947 SEQ ID NO: 1899. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR пары HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 82/858. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в остатках с 14165 по 14178 SEQ ID NO: 1899. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR пары HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 98/170.

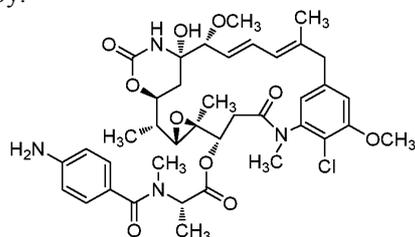
В одном аспекте данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с одним из нескольких доменов SEA MUC16. В различных вариантах осуществления изобретения, анти-MUC16 антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с любым одним из нескольких из SEA1, SEA2, SEA3, SEA4, SEA5, SEA6, SEA7, SEA8, SEA9, SEA10, SEA11, SEA12, SEA13, SEA14, SEA15 или SEA16. В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA1 (остатки от 12074 до 12229 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA2 (остатки от 12230 до 12387 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA3 (остатки от 12388 до 12543 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA4 (остатки от 12544 до 12698 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA5 (остатки от 12699 до 12854 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA6 (остатки от 12855 до 13010 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA7 (остатки от 13011 до 13166 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA8 (остатки от 13167 до 13323 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA9 (остатки от 13324 до 13478 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA10 (остатки от 13479 до 13634 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA11 (остатки от 13635 до 13790 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA12 (остатки от 13791 до 13923 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16

антитело или его фрагмент связывается в SEA13 (остатки от 13924 до 14074 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA14 (остатки от 14075 до 14227 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA15 (остатки от 14228 до 14320 SEQ ID NO: 1899). В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его фрагмент связывается в SEA16 (остатки от 14321 до 14464 SEQ ID NO: 1899).

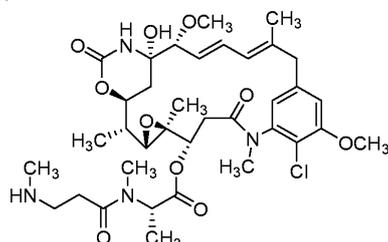
В соответствии с другим аспектом данное изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим анти-MUC16 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и терапевтический агент (например, цитотоксический агент). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксический агент ковалентно связаны через линкер, как обсуждается в настоящем документе. В различных вариантах осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть любым из анти-MUC16 антител или фрагментов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент выбран из ауристинина, майтансиноида, тубулицина, производного томаймицина, или производного доластатина. В некоторых случаях цитотоксический агент представляет собой ауристинин, выбранный из MMAE или MMAF, или майтансиноид, выбранный из DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент представляет собой майтансиноид, имеющий структуру формулы (I) или формулы (II), как обсуждается в настоящем документе.

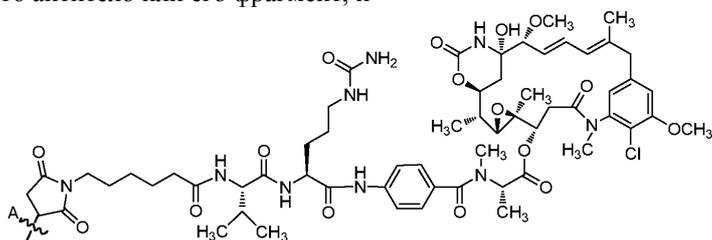
В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент представляет собой майтансиноид, имеющий структуру:



В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент представляет собой майтансиноид, имеющий структуру:

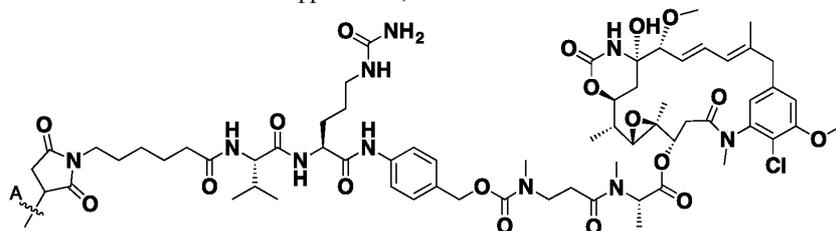


В некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-MUC16 антитело или его фрагмент, и



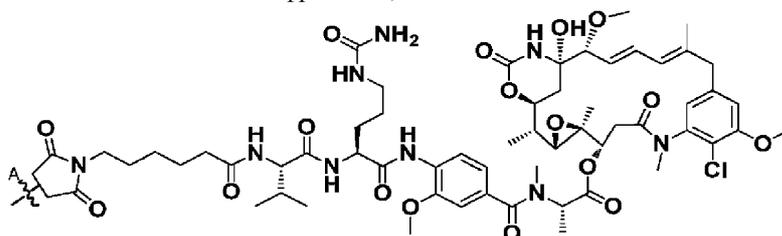
Где  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-MUC16 антитело или его фрагмент, и



где  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом.

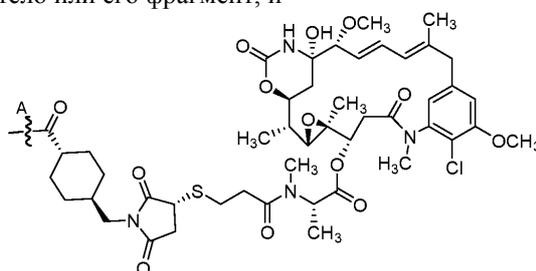
В некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-MUC16 антитело или его фрагмент, и



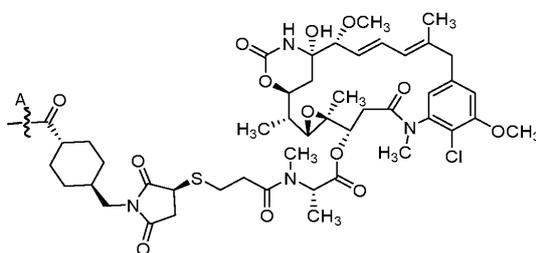
где  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связь контактирует с антителом или его фрагментом через серную составляющую остатка цистеина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-MUC16 антитело или его фрагмент, и



или



или их смесь, где  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связь контактирует с антителом или его фрагментом через азотную составляющую остатка лизина.

В любом из различных вариантов осуществления изобретения конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных выше или в данном документе, конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать от 1 до 4 цитотоксических агентов на анти-MUC16 антитело или его фрагмент.

В соответствии с другим аспектом данное изобретение обеспечивает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, антитела), которые связываются с MUC16 и CD3. Такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также обозначаются в данном документе как "биспецифичные молекулы анти-MUC16/анти-CD3", "биспецифичные молекулы анти-CD3/анти-MUC16" или "бсАт MUC16xCD3". Часть анти-MUC16 анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичной молекулы полезна для нацеливания на клетки (например, опухолевые клетки), которые экспрессируют MUC16 (например, опухоли яичников), а анти-CD3 часть биспецифичной молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание с MUC16 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (лизис клеток) целевой опухолевой клетки, активированной Т-клеткой. Следовательно, биспецифичные молекулы анти-MUC16/анти-CD3 по данному изобретению, следовательно, полезны, среди прочего, для лечения заболеваний и расстройств, связанных с или вызываемых MUC16-экспрессирующими опухолями (например, раком яичников).

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы в соответствии с этим аспектом данного изобретения, содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16. Данное изобретение включает биспецифичные молекулы анти-MUC16/анти-CD3 (например, биспецифичные антитела), в

которых каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), спаренный с вариабельным участком легкой цепи (LCVR). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен анти-CD3 и антигенсвязывающий домен анти-MUC16, каждый, содержат разные, отличные HCVR, спаренные с общим LCVR. Например, как показано в примере 3 в данном документе, были сконструированы биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, причем первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученный из анти-CD3 антитела, спаренный с LCVR, полученный из анти-MUC16 антитела (например, тот же LCVR, который включен в антигенсвязывающий домен анти-MUC16); и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, причем второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR/LCVR, полученный из анти-MUC16 антитела. Другими словами, в иллюстративных молекулах, описанных в данном документе, спаривание HCVR из анти-CD3 антитела с LCVR из анти-MUC16 антитела создает антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 (но не связывается с MUC16). В таких вариантах осуществления изобретения, первый и второй антигенсвязывающие домены содержат различные HCVR анти-CD3 и анти-MUC16, но имеют общий LCVR. В других вариантах осуществления изобретения, биспецифичные антигенсвязывающие молекулы содержат различные HCVR анти-CD3 и анти-MUC16, но имеют общий LCVR. Аминокислотная последовательность этого LCVR показана, например, в SEQ ID NO: 1890, и аминокислотные последовательности соответствующих CDR (то есть LCDR1-LCDR2-LCDR3) показаны в SEQ ID NO: 1892, 1894 и 1896 соответственно. Генетически модифицированные мыши могут быть использованы для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух различных генных сегментов вариабельного участка легкой цепи человека. Альтернативно, вариабельные тяжелые цепи могут быть спарены с одной общей легкой цепью и экспрессироваться рекомбинантно в клетках-хозяевах. Таким образом, антитела по данному изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с одной перестроенной легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из генного сегмента V $\kappa$ 1-39 человека или генного сегмента V $\kappa$ 3-20. В других вариантах осуществления изобретения, легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из генного сегмента V $\kappa$ 1-39 человека, перестроенного с генным сегментом J $\kappa$ 5 человека или генным сегментом J $\kappa$ 1 человека.

Данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, любую из аминокислотных последовательностей LCVR, любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в публикации США 2014/0088295 опубликованной 27 марта 2014 г., и PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 г.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, как указано в табл. 16, 18 и 22 в данном документе. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в данном документе. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе. Данное изобретение также относится к биспецифичным молекулам анти-CD3/анти-MUC16, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, как указано в табл. 16, 18, и 22 в данном документе, и/или любой из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR) имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 16, 18 и 22 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит вариабельный участок легкой цепи (LCVR) имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 6, 19 и 23 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), как указано в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 16, 18 и 22 в настоящем документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в данном документе, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, как указано в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 16, 18 и 22 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислоту, как указано в табл. 16, 18 и 22, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислоту, как указано в табл. 16, 18 и 22, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в настоящем документе, или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 16, 19 и 23 в настоящем документе, или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые не ограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению включают в себя первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержащим HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 домены, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, как указано в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из переменного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащего аминокислотную последовательность, как указано в табл. 16, табл. 18, или табл. 22, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из переменного участка легкой цепи (LCVR), содержащего аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, табл. 16, табл. 19 или табл. 23.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из переменного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762, 1778, 1786 и 1866, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из переменного участка легкой цепи (LCVR), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Кроме того, изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 и 1868; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 и 1870; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В еще одном аспекте, данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1730/26, 1762/26, 1778/26, 1786/26 и 1866/26.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), и причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает MUC16 человека, содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3); причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 и 1868; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 и 1870; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и причем A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

Некоторые не ограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению включают в себя первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержащим тяжелую цепь, содержащую вариативный домен каркасных участков, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из FR1 (SEQ ID NO: 1903), FR2 (SEQ ID NO: 1904), FR3 (SEQ ID NO: 1905) и FR4 (SEQ ID NO: 1906).

В нескольких вариантах осуществления изобретения, иллюстративные анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению включают в себя биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим CD3, содержит HCVR, содержащий HCDR1-HCDR2-HCDR3, имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1907-1908-1909.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит вариативный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 202, 218, 234, 250, 258, 274, 282, 298, 314, 330, 346, 362 и 378 или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит вариативный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10; 26; 42; 58; 74; 90; 106; 122; 138; 154; 170; 186; 210; 226; 242; 266; 290; 306; 322; 338; 354; 370; 386; 1936; и 394, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 208, 224, 240, 256, 264, 280, 288, 304, 320, 336, 352, 368 и 384, или, по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентич-

ности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 216, 232, 248, 272, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 400 и 1942, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16 содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/32.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 204, 220, 236, 252, 260, 276, 284, 300, 316, 332, 348, 364 и 380, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 206, 222, 238, 254, 262, 278, 286, 302, 318, 334, 350, 366 и 382, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 208, 224, 240, 256, 264, 280, 304, 320, 336, 352, 368 и 384, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 396, 212, 228, 244, 396, 268, 396, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 1938 и 388, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен легкой цепи CDR2 (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 398, 214, 230, 246, 398, 270, 398, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 1940 и 390, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 400, 216, 232, 248, 400, 272, 400, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 1942 и 392, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые не ограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению включают в себя второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержащим HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 домены, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32.

В родственном варианте осуществления данное изобретение включает в себя анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, в которых второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16, содержит CDR домены тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в последовательностях переменного участка тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26.

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичное антитело, содержащее плечо, связывающее анти-MUC16, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1959, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1960, и плечо, связывающее анти-CD3, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1961, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1960. В другом варианте осуществления данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичное антитело, содержащее плечо, связывающее анти-MUC16, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1959, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1960, и плечо, связывающее анти-CD3, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1962, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1960.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с MUC16 человека, в котором второй антигенсвязывающий

вающий домен происходит от антитела или антигенсвязывающего фрагмента любого из анти-MUC16 антител по данному изобретению. В дополнительном аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MUC16 человека.

Кроме того, изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с клеткой человека, экспрессирующей CD3 человека, и клеткой яванского макака, экспрессирующей CD3 яванского макака. В другом аспекте биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с клетками человека, экспрессирующими MUC16 человека.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая ингибирует рост опухоли у мышей с иммунной недостаточностью, несущей ксенотрансплантаты рака яичника человека. Данное изобретение, кроме того, относится к биспецифичной антигенсвязывающей молекуле, которая подавляет рост опухолей прижившихся опухолей у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака яичника человека.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, содержащую: i) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с эффекторной клеткой со значением  $EC_{50}$  более чем около 4 нМ и, и ii) второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с целевой клеткой опухоли яичника человека со значением  $EC_{50}$  менее чем 3 нМ, причем такое значение связывания  $EC_{50}$  измеряют в *in vitro* FACS анализе связывания.

В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичная антигенсвязывающая молекула может включать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с целевой клеткой опухоли яичника со значением  $EC_{50}$  менее чем около 2 нМ. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со значением  $EC_{50}$  более чем около 40 нМ, более чем около 100 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 400 нМ, более чем около 500 нМ или более чем около 1 мкМ. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со слабым или не измеримым связыванием или аффинностью связывания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающая молекула индуцирует Т-клеточное уничтожение опухолевых клеток со значением  $EC_{50}$  менее чем около 31 пМ, как измерено в анализе *in vitro* Т-клеточного уничтожения опухолевых клеток, например, где опухолевые клетки представляют собой клетки OVCAR3.

В некоторых применениях, первый антигенсвязывающий домен связывается с CD3 человека со значением  $K_D$  более чем около 11 нМ, как измерено в *in vitro* поверхностно-плазмонном резонансе анализа связывания. В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен связывается с каждым из CD3 человека и CD3 яванского макака со значением  $K_D$ , более чем около 15 нМ, более чем около 30 нМ, более чем около 60 нМ, более чем около 120 нМ, более чем около 300 нМ или более чем около 500 нМ, как измерено в *in vitro* поверхностно-плазмонном резонансе анализа связывания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-CD3 антитела по данному изобретению, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифичные антитела были сделаны путем замены аминокислотных остатков родительского ступенчатым образом на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью родительского антитела.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), где A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим вариативный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариативный участок легкой цепи (LCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 и 1868;

A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 и 1870; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762, 1778, 1786 и 1866, и варибельный участок легкой цепи (LCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762, 1778, 1786 и 1866, и варибельный участок легкой цепи (LCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и в которой второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и варибельный участок легкой цепи (LCVR), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

В одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-MUC16 антигенсвязывающую молекулу или анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичную антигенсвязывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Данное изобретение дополнительно относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей анти-MUC16 антигенсвязывающую молекулу или анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичную антигенсвязывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, включающей рак, включающий рак яичников, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутрипеченочную холангиокарциному массообразующего типа, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта. В некоторых случаях рак представляет собой рак яичников.

В другом аспекте, данное изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичных антигенсвязывающих молекул описанных в данном документе, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, как указано в табл. 2, 17, 20, 21, 23 и 25 в данном документе, а также молекулы нуклеиновой кислоты, включающие две или более полинуклеотидных последовательностей, как указано в табл. 2, 17, 20, 21, 23 и 25 в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по данному изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также включены в изобретение, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела, и восстанавливать произведенные антитела.

Данное изобретение включает в себя анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, в которых любой из указанных выше антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с CD3, объединены, соединены или иным образом связаны с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с MUC16 с образованием биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая связывается с CD3 и MUC16.

Данное изобретение включает в себя анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, имеющие модифицированную схему гликозилирования. В некоторых применениях, модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна, или антитело, лишенное фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть сделана с целью изменения комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте данное изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулы и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируют с анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулой. Иллюстративные агенты, которые могут быть преимущественно комбинированы с анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, включают:

вающей молекулой, подробно обсуждаются в другом месте данного документа.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к терапевтическим способам для нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, с использованием анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению, в котором терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по данному изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом.

Данное изобретение также включает использование анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства связанного или вызванного MUC16-экспрессирующими клетками.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу обнаружения MUC16 в биологическом образце, включающему: получение биологического образца от субъекта, и обнаружение того присутствует ли MUC16 в биологическом образце путем приведения в контакт биологического образца с анти-MUC16 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и выявления связывания между MUC16 и анти-MUC16 антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых случаях биологический образец представляет собой образец ткани или жидкости, выбранный из плазмы, сыворотки, асцита, яичника, матки, шейки матки, печени, мочевого пузыря, поджелудочной железы, желудка, тонкой или толстой кишки, желчного пузыря, молочной железы, легких, почек, слюны, и слезных желез, или любое их эпителиоидное злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает человеческий MUC16 в одном или более из пяти мембранно-проксимальных доменов SEA человеческого MUC16, соответствующих остаткам 13791-14451 SEQ ID NO: 1899. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий MUC16 в остатках 13810-14451 SEQ ID NO: 1899. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с любым из нескольких SEA1, SEA2, SEA3, SEA4, SEA5, SEA6, SEA7, SEA8, SEA9, SEA10, SEA11, SEA12, SEA13, SEA14, SEA15 или SEA16 MUC16 человека.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу обнаружения MUC16 у пациента, включающему: получение образца ткани от пациента; и обнаружение наличия MUC16 в образце ткани путем приведения в контакт образца ткани с анти-MUC16 антителом и обнаружения связывания между MUC16 и анти-MUC16 антителом. В некоторых случаях способ дополнительно включает диагностику пациента больного раком, когда обнаружено присутствие MUC16 в образце ткани. В одном варианте осуществления изобретения, образец ткани представляет собой ткань яичника. В некоторых случаях анти-MUC16 антитело является специфичным для эпитопа в остатках 12783-13467 SEQ ID NO: 1899. В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело содержит CDR пары HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 202/210. В некоторых случаях анти-MUC16 антитело является специфическим для эпитопа в остатках 13810-14451 SEQ ID NO: 1899. В одном варианте осуществления изобретения, анти-MUC16 антитело содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250/1936, 258/266, 314/322 и 1944/1952.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу обнаружения MUC16 у пациента, включающему: получение образца плазмы от пациента; и обнаружение наличия MUC16 в образце плазмы путем приведения в контакт образца плазмы с анти-MUC16 антителом, содержащим CDR пары HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 202/210, и обнаружение связывания между MUC16 и анти-MUC16 антитела. В некоторых случаях способ дополнительно включает диагностику пациента больного раком, когда обнаружено присутствие MUC16 в образце плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает введение эффективного количества биспецифичного анти-CD3xMUC16 антитела диагностированному пациенту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает введение эффективного количества ADC, содержащего анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и цитотоксического агента для диагностированного пациента.

В другом аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с MUC16, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202/210, 250/1936, 258/266, 314/322, 82/858, 98/170 и 1944/1952. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 204-206-208-212-214-216; 252-254-256-1938-1940-1942; 260-262-264-268-270-272; 316-318-320-324-326-328; 84-86-88-1892-1894-1896; 100-102-104-172-174-176; и 1946-1948-1950-1954-1956-1958. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит парную аминокислотную последовательность HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из 202/210, 250/1936, 258/266, 314/322, 82/858, 98/170, и 1944/1952.

Другие варианты реализации данного изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1-3 иллюстрируют фармакокинетические профили анти-MUC16 x CD3 биспецифичных анти-тел у мышей дикого типа (фиг. 1), гуманизированных CD3 мышей (фиг. 2) или гуманизированных MUC16 x CD3 мышей (фиг. 3).

На фиг. 4 продемонстрированы результаты исследования 1 модели OVCAR-3 (средн. излучение [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] в день 6). Все группы имели одинаковую опухолевую нагрузку, как оценивали с помощью BLI до начала дозирования. Показанные данные представляют собой опухолевую нагрузку, оцененную с помощью BLI на 6 день после имплантации опухоли. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Не было значительного различия в опухолевой нагрузке между группами.

На фиг. 5 продемонстрированы результаты исследования 1 модели OVCAR-3 (средн. излучение [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] в день 20). BSMUC16/CD3-001 значительно снижает опухолевую нагрузку при 0,1 и 0,5 мг/кг. Мышам NSG, которым имплантировали человеческие Т-клетки, имплантировали клетки OVCAR-3/Лус человека. Лечение началось через 6 дней после имплантации опухоли. Мышей обрабатывали в дни 6, 10, 13, 16 и 21 0,01, 0,1 или 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-001, которые вводили внутривенно, или обрабатывали контролем CD3-связывания или контролем без связывания (0,5 мг/кг внутривенно). Показанные данные представляют собой опухолевую нагрузку, оцененную с помощью BLI на 20-й день после имплантации опухоли. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Лечение с помощью BSMUC16/CD3-001 сравнивалось с контролем без связывания (\*\* p < 0,01 для 0,5 мг/кг, # p < 0,05 для 0,1 мг/кг BSMUC16/CD3-001).

На фиг. 6 продемонстрированы результаты исследования 1 модели OVCAR-3 (кратность изменения в BLI-доказанных опухолях между D6 и D20). BSMUC16/CD3-001 значительно уменьшает кратность изменения опухолевой нагрузки при 0,01, 0,1 и 0,5 мг/кг. Мышам NSG, которым имплантировали человеческие Т-клетки, имплантировали клетки OVCAR-3/Лус человека. Мышей обрабатывали в дни 6, 10, 13, 16 и 21 0,01, 0,1 или 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-001, которые вводили внутривенно, или обрабатывали контролем CD3-связывания или контролем без связывания (0,5 мг/кг внутривенно). Показанные данные представляют собой кратность изменения в опухолевой нагрузке от первого измерения (взятого до начала лечения) и на 20-й день в конце исследования. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Лечение с помощью BSMUC16/CD3-001 сравнивалось с контролем без связывания (\*\* p < 0,01 для 0,5 мг/кг, # p < 0,05 для 0,1 мг/кг, § p < 0,05 для 0,01 мг/кг BSMUC16/CD3-001).

На фиг. 7 продемонстрированы результаты исследования 2 модели OVCAR-3 (средн. излучение [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] в день 4). Все группы имели одинаковую опухолевую нагрузку, как оценивали с помощью BLI до начала дозирования. Показанные данные представляют собой опухолевую нагрузку, оцененную с помощью BLI на 4-й день после имплантации опухоли. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Не было значительного различия в опухолевой нагрузке в день 4 между группами.

На фиг. 8 продемонстрированы результаты исследования 2 модели OVCAR-3 (средн. излучение [ф/с/см<sup>2</sup>/ср] в день 25). BSMUC16/CD3-005 значительно снижает опухолевую нагрузку при 0,5, 1 и 5 мг/кг. Мышам NSG, которым имплантировали человеческие Т-клетки, имплантировали клетки OVCAR-3/Лус человека. Лечение началось через 5 дней после имплантации опухоли. Мышей лечили в дни 5, 8, 12, 15, 19 и 22 с 0,1, 0,5, 1 или 5 мг/кг REGN4019, которые вводили в/в, или вводили контроль CD3-связывания или контроль без связывания (5 мг/кг в/в). Показанные данные представляют собой опухолевую нагрузку, оцененную с помощью BLI на 25-й день после имплантации опухоли. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Лечение с помощью BSMUC16/CD3-005 сравнивалось с контролем без связывания (\*\* p < 0,01 для 5 мг/кг, ## p < 0,01 для 1 мг/кг, § p < 0,01 для 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-005).

На фиг. 9 продемонстрированы результаты исследования 2 модели OVCAR-3 (кратность изменения в BLI-доказанных опухолях между D4 и D25). BSMUC16/CD3-005 значительно снижает рост опухоли при 0,5, 1 и 5 мг/кг. Мышам NSG, которым имплантировали человеческие Т-клетки, имплантировали клетки OVCAR-3/Лус человека. Мышей лечили в дни 5, 8, 12, 15, 19 и 22 с 0,1, 0,5, 1 или 5 мг/кг REGN4019, которые вводили в/в, или обрабатывали CD3-связывающим контролем или контролем без связывания (5 мг/кг в/в). Показанные данные представляют собой кратность изменения в опухолевой нагрузке от первого измерения (взятого за день до начала лечения) и на 25-й день в конце исследования. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Лечение с помощью BSMUC16/CD3-005 сравнивалось с контролем без связывания (\*\* p < 0,01 для 5 мг/кг, ## p < 0,01 для 1 мг/кг, § p < 0,01 для 0,5 мг/кг REGN4019).

На фиг. 10 приведены результаты модели ID8-VEGF/huMUC16. Размер опухоли на 47-й день после имплантации BSMUC16/CD3-001 значительно уменьшает рост опухоли в сингенной модели, когда лечение начинается либо в день имплантации, либо через 10 дней после имплантации опухоли. Мышам, экспрессирующим CD3 человека вместо мышинового CD3, и химерную молекулу MUC16 имплантировали

линию опухоли мышинового яичника, экспрессирующую часть человеческого MUC16. Мышам вводили BSMUC16/CD3-001 (100 мкг внутрибрюшинно) в день имплантации или 10 дней после имплантации или вводили CD3-связывающий контроль (100 мкг внутрибрюшинно) в день имплантации. Мышей лечили в дни 0, 4, 7, 10, 13, 17, 20 или 2 4 для групп экстренного лечения и в дни 10, 13, 17, 20 и 24 для группы, где дозирование началось на Д10. Показанные данные представляют собой объем опухоли на 47 день после имплантации. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических *t*-критериев Манна-Уитни. Лечение с помощью BSMUC16/CD3-001 сравнивалось с контролем связывания CD3 (\*\*  $p < 0,01$ , начиная с Д0, \*  $p < 0,05$ , начиная с Д10).

Фиг. 11А-11С иллюстрируют результаты анализа проточной цитометрии (или FACS) связывания выбранных биспецифичных антител с PEO-1, OVCAR3-Лус, клетками Jurkat, и Т-клетками яванского макака. Анализ титрования проводили путем тестирования ряда серийных разведений каждого антитела: либо биспецифичных антител MUC16хCD3 BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-002, либо BSMUC16/CD3-003, либо первого или второго антитела изотипического контроля (не имеющего перекрестной реактивности к CD3 или MUC16).

Фиг. 12А и 12В изображают примеры уничтожения клеток PEO-1 (фиг. 12А) или OVCAR3-Лус (фиг. 12В) в анализе 48 ч цитотоксичности следующим анти-MUC16 х анти-CD3 лечением в присутствии человеческих РВМС.

### Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации данного изобретения и не является ограничивающей, так как объем данного изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном документе, выражение "около 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или при испытании данного изобретения, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и не патентные публикации, упомянутые в этом описании, включены в данный документ путем ссылки во всей их полноте.

### Определения

Выражение "CD3", используемое в данном документе, относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в составе мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (TCR), и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного из ассоциации двух из четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-зета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 97; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1898. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в настоящем документе предназначены для ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что он относится к виду, отличному от человека. Таким образом, выражение "CD3" означает CD3 человека, если не указано, что он относится к нечеловеческому виду, например, "CD3 мыши", "CD3 обезьяны" и т.д.

Используемый в данном документе термин "антитело, которое связывается с CD3" или "анти-CD3 антитело" включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну CD3 субъединицу (например, эпсилон, дельта, гамма или зета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс двух субъединиц CD3 (например, димеры гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета CD3). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или экспрессируемый на клеточной поверхности CD3. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также варианты рекомбинантных белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкторы CD3, которые не имеют трансмембранного домена или иным образом не связаны с мембраной клетки.

Как используется в данном документе, выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клеток" означает один или более CD3 белка(ов), который/которые экспрессированы на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* таким образом, что по меньшей мере часть белка CD3 экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" включает в себя белки CD3, содержащиеся в контексте функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета CD3). Выражение "CD3, экс-

прессуемый на клеточной поверхности" также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе, без других типов цепи CD3, на поверхности клетки. "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может включать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. Альтернативно, "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может включать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий CD3 на своей поверхности, но была сконструирована искусственно для экспрессии CD3 на ее поверхности.

Выражение "MUC16", используемое в данном документе, относится к муцину 16. MUC16 представляет собой одиночный трансмембранный домен сильно гликозилированного интегрального мембранного гликопротеина, высоко экспрессирующийся при раке яичников. Аминокислотная последовательность человеческого MUC16 приведена в SEQ ID NO: 1899.

Используемый в данном документе термин "антитело, которое связывает MUC16" или "анти-MUC16 антитело" включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают MUC16.

Термин "антигенсвязывающая молекула" включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе, например, биспецифичные антитела.

Термин "антитело", используемый в данном документе, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), который специфически связывается с или взаимодействует с конкретным антигеном (например, MUC16 или CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенно обозначенный в данном документе как HCVR или  $V_H$ ) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенно обозначенный в данном документе как LCVR или  $V_L$ ) и константный участок легкой цепи ( $C_L$ ). Константный участок легкой цепи содержит один домен ( $C_{L1}$ ). Участки  $V_H$  и  $V_L$  могут быть далее подразделены на участки гипервариабельности, которые называются участками, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения, FR анти-MUC16 антитела или анти-CD3 антитела (или их антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека, или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Термин "антитело", используемый в данном документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, как используется в данном документе, включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с целью образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генетической инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и тому подобного.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAt; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такой как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и тому подобное), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как применяется в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный

домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который находится рядом или в рамке считывания с одной или более последовательностями каркаса. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен  $V_H$ , ассоциированный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельный участок может быть димерным и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В альтернативном варианте, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают: (i)  $V_H$ - $C_H1$ ; (ii)  $V_H$ - $C_H2$ ; (iii)  $V_H$ - $C_H3$ ; (iv)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (v)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vi)  $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vii)  $V_H$ - $C_L$ ; (viii)  $V_L$ - $C_H1$ ; (ix)  $V_L$ - $C_H2$ ; (x)  $V_L$ - $C_H3$ ; (xi)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (xii)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (xiii)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; и (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из приведенных выше типовых конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны полноразмерным или частичным шарнирным, или линкерным участком. Шарнирный участок может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, дисульфидной связью(ами)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифичных антител, включая описанные в данном документе типовые биспецифичные форматы антител, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению с применением обычных методов, доступных в данной области техники.

Антитела согласно данному изобретению могут функционировать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). "Комплементзависимая цитотоксичность" (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом по данному изобретению в присутствии комплемента. "Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки натуральных киллеры (НК), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанные антитела на клетке-мишени и тем самым приводят к лизису клетки-мишени. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (США) 95:652-656). Константный участок антитела важен для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательна ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-MUC16 моноспецифичные антитела или анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичные антитела по данному изобретению представляют собой человеческие антитела. Применяемый в данном документе термин "человеческое антитело" предполагает антитела, имеющие вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела по данному изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт специфическим мутагенозом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", как применяется в данном документе, не предназначен для включения антител, в котором последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были присоединены к каркасным последовательностям человека.

Антитела по данному изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления изобретения, быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как используется в данном документе, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описанной дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного

(например, мыши), которое трансгенно для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для последовательностей человеческих Ig животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с шарнирной гетерогенностью. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепочечный конструктор приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изоформах интактных IgG обусловлено, но не ограничиваясь этим, структурными различиями, связанными с шарнирным участком изоформы антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирном участке шарнира человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнире,  $C_H2$  или  $C_H3$  участке, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по данному изобретению могут быть выделенными антителами. "Выделенное антитело", как используется в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом" для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

Данное изобретение также включает в себя антитела с одним плечом, которые связываются MUC16. Используемый в данном документе термин "антитело с одним плечом" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь одного антитела и легкую цепь одного антитела. Антитела с одним плечом по данному изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1.

Анти-MUC16 или анти-MUC16/анти-CD3 антитела, описанные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из баз данных общедоступных антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом одна или более аминокислот в одном или более каркасных участках и/или участках CDR мутированы с соответствующим остатком(ами) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменного участка тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных зародышевых мутаций или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления изобретения только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или

CDR3. В других вариантах осуществления изобретения один или более каркасный остаток(ов) и/или остаток(ки) CDR мутируют с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии (то есть последовательностью зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было изначально получено). Кроме того, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в рамках каркасных участков и/или участков CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, улучшенное связывание (например, измеренное титрованием связывания клеток или связыванием FACS) или аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), уменьшенную иммуногенность и тому подобное. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа, охватываются данным изобретением.

Данное изобретение также включает анти-MUC16 или анти-MUC16/анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает анти-MUC16 или анти-MUC16/анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1 в данном документе или в соответствии с описанием в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере, в количестве около 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу аналогичный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, имеют последовательность идентичную на по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно, последовательность идентичную на по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники; см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной в данный документ в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боко-

вые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445, включенной в данный документ в качестве ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которые также упоминаются как идентичность последовательности, как правило, измеряются с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом; см., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться, используя FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравнивания и процент последовательности областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию; см., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки.

Мутации зародышевой линии.

Анти-CD3 антитела, описанные в данном документе, содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-участках переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом одна или более аминокислот в одном или более каркасных участках и/или участках CDR мутированы с соответствующим остатком(ами) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "зародышевые мутации") и имеющие слабое или не обнаруживаемое связывание с антигеном CD3. Несколько таких типичных антител, которые распознают CD3, описаны в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

Кроме того, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в рамках каркасных участков и/или участков CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно тестировать на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, слабое или пониженное связывание или аффинность связывания, улучшенные или увеличенные фармакокинетические свойства, пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом с учетом руководства по данному изобретению, включены в данное изобретение.

Данное изобретение также включает анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе. Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-участках переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых индивидуальные антигенсвязывающие домены были получены при сохранении или улучшении желаемого слабого или не детектируемого свя-

звания с антигеном CD3. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка, то есть аминокислотная замена поддерживает или улучшает желаемую слабую или не обнаруживаемое связывание или аффинность связывания в случае анти-CD3 связывающих молекул. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с HCVR и/или аминокислотной последовательностью CDR, которая по существу идентична любой из HCVR и/или CDR аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при сохранении или улучшении желаемой слабой аффинности к антигену CD3. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих веса гэпов по умолчанию, имеют общую по меньшей мере 95% идентичность последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники; см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. 152 Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом; см., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться, используя FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравнивания и процент последовательности областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию; см., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.

После того, как получены его антигенсвязывающие домены, которые содержат один или более задыхшевых мутации были протестированы на пониженное связывание или аффинность связывания с использованием одного или более анализов *in vitro*. Хотя антитела, которые распознают конкретный антиген, обычно подвергают скринингу по назначению путем тестирования на высокое (то есть сильную) связывание или аффинность связывания с антигеном, антитела по данному изобретению демонстрируют слабое связывание или не обнаруживают связывания. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, также включены в данное изобретение и, как было обнаружено, являются предпочтительными в качестве терапии опухолей, обусловленной авидностью.

Неожиданные преимущества, например, улучшенные фармакокинетические свойства и низкая токсичность для пациента могут быть реализованы из способов, описанных в данном документе.

Связывающие свойства антител.

Как использовано в данном документе, термин "связывание" в контексте связывания антитела, иммуноглобулин, антигенсвязывающий фрагмент, или Fc-содержащий белок, либо, например, заранее определенный антиген, такой как белок клеточной поверхности или его фрагмент, обычно относится к взаимодействию или ассоциации между минимумом двух объектов или молекулярных структур, таким как взаимодействие антитело-антиген.

Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению  $K_D$  около  $10^{-7}$  М или менее, например, около  $10^{-8}$  М или менее, например около  $10^{-9}$  М или менее, когда определяется, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, антителосвязывающего фрагмента или Fc-содержащего белка в качестве анализата (или антилиганда). Клеточные стратегии связывания, такие как флуоресцентно-активируемая сортировка клеток (FACS), также обычно используются, и данные FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолиганда и SPR (Benedict, CA, J. Immunol Methods. 1997, 201 (2): 223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302 (1-2): 68-77).

Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий белок по данному изобретению связывается с заранее определенным антигеном или молекулой клеточной поверхности (рецептора), имеющего сродство, соответствующее значению  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем его сродство к связыванию с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин). В соответствии с данным изобретением аффинность антитела, соответствующего значению  $K_D$ , которое равно или менее чем в десять раз меньше, чем у неспецифического антигена, можно рассматривать как не обнаружимое связывание, однако такое антитело может быть спарено со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела по данному изобретению.

Термин " $K_D$ " (М) относится к диссоциации равновесной константы конкретного взаимодействия антиген-антитело, или диссоциации равновесной константы антитела или антителосвязывающего фрагмента связывания с антигеном. Существует обратная зависимость между  $K_D$  и аффинностью связывания, поэтому чем меньше значение  $K_D$ , тем выше, то есть сильнее, аффинность. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к более высокой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению  $K_D$ , и наоборот, термины "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к более низкой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, большему значению  $K_D$ . В некоторых обстоятельствах более высокая аффинность связывания (или  $K_D$ ) конкретной молекулы (например, антитела) с ее интерактивной молекулой-партнером (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой интерактивной молекулой-партнером (например, антигеном Y) может быть выражена как отношение связывания, определяемое путем деления большего значения  $K_D$  (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее значение  $K_D$  (более высокая или более сильная аффинность), например, выраженная как 5-кратная или 10-кратная большая аффинность связывания, в зависимости от обстоятельств.

Термин " $k_d$ " (с<sup>-1</sup> или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело, или константы скорости диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Указанное значение также называется значением  $k_{off}$ .

Термин " $k_a$ " (М<sup>-1</sup> x сек<sup>-1</sup> или 1/М) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или константе скорости ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента.

Термин " $K_A$ " (М<sup>-1</sup> или 1/М), относится к ассоциации константы равновесия конкретного взаимодействия антитело-антиген, или ассоциации константы равновесия антитела или антителосвязывающего фрагмента. Константа равновесия ассоциации получается путем деления  $k_a$  на  $k_d$ .

Термин "EC50" или "EC<sub>50</sub>" относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает в себя концентрацию антитела, которое индуцирует ответ на полпути между базовой линией и максимумом после того, как указано время воздействия. EC<sub>50</sub> по существу представляет собой концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения, значение EC<sub>50</sub> равно концентрации антитела по данному изобретению, которая дает половинное максимальное связывание с клетками, экспрессирующими CD3 или антигена, ассоциированного с опухолью, как определено, например, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, пониженное или более слабое связывание наблюдается при увеличении EC<sub>50</sub> или половине значения максимальной эффективной концентрации.

В одном варианте осуществления изобретения, уменьшение связывания может быть определено как увеличение концентрации EC<sub>50</sub> антитела, которое дает возможность связывания с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

В другом варианте осуществления изобретения, значение EC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию антитела по данному изобретению, которое вызывает половину максимального истощения клеток-мишеней с помощью Т-клеточной цитотоксической активности. Таким образом, повышенная цитотокси-

ческая активность (например, опосредованная Т-клетками гибель опухолевых клеток) наблюдается при сниженном значении  $EC_{50}$  или половине значения максимальной эффективной концентрации.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы.

Антитела по данному изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными.

Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида; см., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Моноспецифичные анти-MUC16 антитела или биспецифичные анти-MUC16/анти-CD3 антитела по данному изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

Использование выражения "анти-CD3 антитело" или "анти-MUC16 антитело" в данном документе предназначено для включения как моноспецифичного анти-CD3 или анти-MUC16 антител, а также биспецифичных антител, содержащих CD3-связывающее плечо и MUC16-связывающее плечо. Таким образом, данное изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывается с CD3 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным для MUC16 человека. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1, 16, 18, 19, 22 и 23 в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD3-связывающее плечо связывается с CD3 человека и вызывает активацию Т-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-клеток человека. В других вариантах осуществления изобретения, CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует уничтожение ассоциированных с опухолью антиген-экспрессирующих клеток в контексте биспецифичного или мультиспецифичного антитела. В других вариантах осуществления изобретения, CD3-связывающее плечо связывается или слабо связывается с CD3 человека и яванского макака (обезьяны), однако взаимодействие связывания не выявляется с помощью анализов *in vitro*, известных в данной области. MUC16-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в данном документе.

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления изобретения, данное изобретение включает биспецифичные антиген-связывающие молекулы, которые специфически связываются с CD3 и MUC16. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе как, например, биспецифичные молекулы "анти-CD3/анти-MUC16", "анти-CD3xMUC16" или "CD3xMUC16" или другая подобная терминология (например, анти-MUC16/анти-CD3). Данное изобретение обеспечивает биспецифичные антиген-связывающие молекулы, сконструированные с первым антигенсвязывающим плечом, которое связывается с MUC16, и вторым антигенсвязывающим плечом, которое связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-CD3 плечо содержит тяжелую цепь, происходящую отIGHV3-9\*01,IGHJ6\*02,IGHD5-12\*01. В других вариантах осуществления изобретения, биспецифичная антигенсвязывающая молекула активирует клетки РВМС человека и/или индуцирует цитотоксическую активность на опухолевых антиген-экспрессирующих клеточных линиях.

Термин "MUC16", используемый в данном описании, относится к белку MUC16 человека, если не указано, что он относится к виду отличному от человека (например, "MUC16 мыши", "MUC16 обезьяны" и т.д.). Белок MUC16 человека имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 18 99.

Вышеупомянутые биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связываются с CD3 и MUC16 могут содержать анти-CD3 антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD3 со слабой аффинностью связывания, таким как экспонирование  $K_D$  более чем около 40 нМ, как измерено анализом аффинного связывания *in vitro*. Вышеупомянутые биспецифичные антигенсвязывающие молекулы могут содержать анти-CD3 антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD3 и демонстрирует  $EC_{50}$  более чем около 100 нМ, как измерено анализом титрования FACS. Вышеупомянутые биспецифичные антигенсвязывающие молекулы могут содержать анти-CD3 антигенсвязывающую молекулу, которая не проявляет измеримого или наблюдаемого связывания с CD3, как измерено с помощью анализа аффинности связывания *in vitro* или анализа титрования FACS, но сохраняет способность активировать клетки РВМС человека и/или индуцируют цитотоксическую активность в отношении линий опухолевых антиген-экспрессирующих клеток.

Как используется в данном документе, выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс содержащий или состоящий по меньшей мере из одного определяющего комплементарности участка (CDR), который по отдельности или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или каркасными участками (FR), специфически связывается с конкрет-

ным антигеном. В определенных вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определены в другом месте данного документа.

Как используется в данном документе, выражение "биспецифичная антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифичной антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере один CDR, который по отдельности или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или FR, специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте данного изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй отличный антиген (например, MUC16).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVR) и вариабельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифичное антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначаться с префиксом "A1", и CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться префиксом "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут упоминаться в данном документе как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться в данном документе как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть непосредственно или косвенно соединены друг с другом с образованием биспецифичной связывающей антиген-молекулы данного изобретения. Альтернативно, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, каждый, могут быть связаны с отдельным мультимеризирующим доменом. Ассоциация одного мультимеризирующего домена с другим мультимеризирующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифичную антигенсвязывающую молекулу. Используемый в данном документе термин "мультимеризирующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая обладает способностью связываться со вторым мультимеризирующим доменом той же или сходной структуры, или конституции. Например, мультимеризирующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризирующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3), например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой группе изоформ.

Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению, как правило, содержат два мультимеризирующих домена, например, два Fc домена, каждый из которых по отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризирующие домены могут иметь один и тот же изоформ IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4.

Альтернативно, первый и второй мультимеризирующие домены могут иметь разные изоформы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мультимеризирующий домен представляет собой Fc фрагмент или аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до около 200 аминокислот в длину, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления изобретения, мультимеризирующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризирующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива со спиральной петлей или мотива со спиральной катушкой.

Любой формат биспецифичного антитела или технологии может быть использован, чтобы создать биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению. Например, антитело или его фрагмент, имеющий первую антигенсвязывающую специфичность, может быть функционально связано (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющий вторую антигенсвязывающую специфичность для получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифичные форматы, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, Квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и тому подобное), CrossMab, CrossFab, (SEED) тело, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab<sup>2</sup> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов).

В контексте биспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, в мультимеризирующие домены, например, Fc домены, могут включать одно или более аминокислотных изменений

(например, инсерции, делеции или замены) по сравнению с диким типом, природно возникающей версией Fc-домена. Например, изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, что приводит к тому, что модифицированный Fc-домен имеет модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления изобретения, биспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в участке C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, причем эта модификация увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьируется от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления изобретения, модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Данное изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C<sub>H</sub>3 и второй домен Ig3 C<sub>H</sub>3, причем первый и второй домены C<sub>H</sub>3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и причем разница в по меньшей мере одну аминокислоту снижает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, в котором отсутствует аминокислотная разница. В одном варианте осуществления изобретения первый домен C<sub>H</sub>3 Ig связывается с белком А, а второй домен C<sub>H</sub>3 Ig содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание с белком А, такое как при модификации H95R (согласно нумерации экзонов IMGT, H435R согласно нумерации EC). Второй C<sub>H</sub>3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EC); см., например, патент США № 8586713. Другие модификации, которые могут быть найдены во втором C<sub>H</sub>3, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EC) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EC) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EC) в случае антител IgG4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc домен может быть химерным, сочетающим в себе Fc последовательности, полученные из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный Fc домен может содержать часть или всю последовательность C<sub>H</sub>2, полученную из участка C<sub>H</sub>2 человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, и часть или всю последовательность C<sub>H</sub>3, полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Химерный Fc домен также может содержать химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или шарнирного участка человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или шарнирного участка человеческого IgG4. Конкретный пример химерного Fc домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [IgG4 C<sub>H</sub>1] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] [IgG4 C<sub>H</sub>2] - [IgG4 C<sub>H</sub>3]. Другой пример химерного Fc домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [IgG1 C<sub>H</sub>1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] [IgG4 C<sub>H</sub>2] - [IgG1 C<sub>H</sub>3]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, описаны в публикации США 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 г., которая полностью включена в настоящий документ. Химерные Fc-домены, имеющие эти общие структурные расположения и их варианты, могут иметь измененное связывание с Fc-рецептором, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к тяжелой цепи антитела, в которой участок константного участка тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 или SEQ ID NO: 1920. В некоторых вариантах осуществления изобретения, участок константного участка (CH) тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 и SEQ ID NO: 1920.

В других вариантах осуществления данное изобретение относится к тяжелой цепи антитела, в которой Fc домен содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную лю-

бой из SEQ ID NO: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 или SEQ ID NO: 1930. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 и SEQ ID NO: 1930.

Варианты последовательности.

Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-участках переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых индивидуальные антигенсвязывающие домены были получены. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из баз данных общедоступных антител. Антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые происходят от любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом одна или более аминокислот в одном или более каркасных участках и/или участках CDR мутированы с соответствующим остатком (ами) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменного участка тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных зародышевых мутаций или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой первоначально был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления изобретения только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления изобретения, один или более каркасный остаток(ов) и/или остаток(ки) CDR мутируют с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии (то есть последовательностью зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антигенсвязывающий домен было изначально получено). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в рамках каркасных участков и/или участков CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенное связывание или аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, охватываются данным изобретением.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, причем один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из описанных в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидрофильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспаргин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодер-

жащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в данный документ в качестве ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR, и/или CDR, которая по существу идентична любой из HCVR, LCVR и/или CDR аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих веса гэпов по умолчанию, имеют общую по меньшей мере 95% идентичность последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники; см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 3 07-331, включенной в данный документ в качестве ссылки.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом; см., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться, используя FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравнивания и процент последовательности областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию; см., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки.

рН-зависимое связывание.

Данное изобретение включает в себя анти-MUC16 антитела и анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, анти-MUC16 антитело по данному изобретению может проявлять пониженное связывание с MUC16 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Альтернативно, анти-MUC16 антитела по данному изобретению могут проявлять усиленное связывание с MUC16 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение "кислый рН" включает значения рН менее чем около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в данном документе выражение "нейтральный рН" означает рН от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральный рН" включает значения рН около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях, "уменьшенное связывание... при кислом рН, по сравнению с нейтральным рН" выражается в терминах соотношения величины  $K_D$  связывания антитела со своим антигеном при кислом рН до значения  $K_D$  антитела, связывающегося с его антигеном, при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие "пониженное связывание с MUC16 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" для целей данного изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют кислый/нейтральный коэффициент  $K_D$  около 3,0 или более. В некоторых примерных вариантах осуществления изобретения, кислый/нейтральный коэффициент  $K_D$  для антитела или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител для снижения (или усиления) связывания с конкретным антигеном при

кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина может быть получено антитело с пониженным антигенсвязыванием при кислом pH относительно нейтрального pH.

Антитела, содержащие варианты Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, анти-MUC16 антитела, и анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые при условии, что содержащий Fc-домен, содержащий одну или более мутации, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает антитела, содержащие мутацию в участке C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 Fc-домена, причем мутация(и) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH колеблется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела из сыворотки при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификация в позиции 250 и/или 428; или модификация в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления изобретения, модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, данное изобретение включает в себя анти-MUC16 антитела и анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутации, выбранные из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антитела, описанных в данном документе, рассматриваются в объеме данного изобретения.

Биологическая характеристика антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MUC16 человека с высокой аффинностью (например, субнаномолярные значения K<sub>D</sub>).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, данное изобретение включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим MUC16 (например, при 25°C) с K<sub>D</sub> менее, чем около 60 нМ, как измеряется поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связываются с MUC16 с K<sub>D</sub> менее чем около 60 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 8 нМ, менее чем около 7 нМ, менее чем около 6 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 4 нМ, менее чем около 3 нМ, менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ, менее чем около 800 пМ, менее чем около 700 пМ, менее чем около 500 пМ, менее чем около 400 пМ или менее чем около 300 пМ, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе (например, захват mAt или формат захвата антигена), или по существу аналогичный анализ. Данное изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела, которые связываются с MUC16 с K<sub>D</sub> менее чем около 7 нМ, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе (например, формат захвата mAt или захвата антигена), или по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MUC16 с диссоциирующей полужизнью (t<sub>1/2</sub>) более чем около 10 минут или более, чем около 125 минут, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связываются с MUC16 с t<sub>1/2</sub> более чем около 10 минут, более чем около 20 минут, более чем около 30 минут, более чем около 40 минут, более чем около 50 минут, более чем около 60 минут, более чем около 70 минут, более чем около 80 минут, более чем около 90 минут, более чем около 100 минут, более чем около 110 минут или более чем около 120 минут, измеренных с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе (например, захвата mAt или формата захвата антигена), или по существу аналогичного анализа. Данное изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела, которые связываются с MUC16 с более чем

около 10 минут или более чем около 20 минут, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе, или по существу аналогичным анализом.

Данное изобретение также включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с линиями клеток человека, которые экспрессируют эндогенный MUC16 (например, OVCAR-3), как определено анализом обнаружения на основе электрохемолуминисценции, как описано в примере 2, или по существу аналогичным анализом.

Данное изобретение также включает в себя анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые обладают одной или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (а) ингибирования роста опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака яичника человека; и (б) подавления роста опухоли у установленных опухолей у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака яичника человека (см., например, пример 8).

Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3 человека с высокой аффинностью. Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных желательных целевых свойств. В некоторых случаях низкая аффинность включает в себя антитела, которые связываются с CD3 с  $K_D$  или  $EC_{50}$  (например, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса), более чем 300 нМ, более чем 500 нМ или более чем 1 мкМ. Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD3 человека без измеримой аффинности. Например, в контексте биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывается с CD3, а другое плечо связывается с целевым антигеном (например, MUC16), может быть желательно, чтобы целевое антигенсвязывающее плечо связывалось с целевым антигеном с высокой аффинностью, в то время как анти-CD3 плечо связывается с CD3 только с умеренной или низкой аффинностью или без аффинности. Таким образом, может быть достигнуто предпочтительное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, при этом избегая общего/нецелевого связывания с CD3 и связанных с ним побочных эффектов.

Данное изобретение включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифичные антитела), которые способны одновременно связываться с CD3 человека и MUC16 человека. Плечо связывания, которое взаимодействует с клетками, которые экспрессируют CD3, может иметь слабое или не обнаруживаемое связывание, как измерено в подходящем анализе связывания *in vitro*. Степень, до которой биспецифичная антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD3 и/или MUC16, может быть оценена с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), как показано в примере 5 в данном документе.

Например, данное изобретение включает в себя антитело, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифичные антитела, которые специфически связывают линии Т-клетки человека, которые экспрессируют CD3, но не экспрессируют MUC16 (например, Jurkat), Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови яванского макака [PBMC]) и/или клетки, экспрессирующие MUC16.

Данное изобретение включает в себя антитело, антигенсвязывающие фрагменты, и их биспецифичные антитела, которые связываются с CD3 человека со слабой (то есть низкой) или даже без обнаруживаемого связывания или аффинности связывания.

Данное изобретение включает в себя антитело, антигенсвязывающие фрагменты, и их биспецифичные антитела, которые связываются с CD3 обезьяны (т.е. яванского макака) со слабой (т.е. низким) или даже без заметного связывания или аффинности связывания.

Данное изобретение включает в себя антитело, антигенсвязывающие фрагменты, и их биспецифичные антитела, которые связываются с CD3 человека и индуцирует активацию Т-клетки.

Данное изобретение включает в себя анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичных антигенсвязывающих молекул, которые способны к разрушению опухолевой антиген-экспрессирующей клетки у субъекта (см., например, пример 8, в биолюминесцентном анализе изображений или по существу аналогичном анализе). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предлагаются анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, в которых однократное введение 10 мкг биспецифичной антигенсвязывающей молекулы субъекту вызывает уменьшение количества MUC16-экспрессирующих клеток у субъекта (например, рост опухоли у субъекта подавляется или ингибируется). Если не указано иное, биолюминесцентное излучение относится к  $[ф/с/см^2/ср]$ .

Данное изобретение также включает конъюгаты анти-MUC16 антитела с лекарственным препаратом, которые ингибируют рост опухоли в *in vivo* MUC16-позитивных моделях ксенотрансплантата рака яичника (см., например, пример 10, в анализе биолюминесцентной визуализации или по существу аналогичном анализе). В некоторых вариантах осуществления изобретения, предоставлены конъюгаты анти-MUC16 антитела с лекарственным препаратом с соединением 7, в которых четыре дозы один раз в неделю, вводимые в дозе 85 мкг/кг, ингибируют внутрибрюшинный рост опухоли OVCAR3/luc *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предоставлены конъюгаты анти-MUC16 антитела с лекарственным препаратом с соединением 7, в которых четыре дозы один раз в неделю, вводимые в дозе 85

мкг/кг, ингибируют подкожный рост опухоли OVCAR3/luc in vivo. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предоставлены конъюгаты анти-MUC16 антитела с лекарственным препаратом с соединением 10, в которых однократная доза в дозе 85 мкг/кг, 170 мкг/кг или 340 мкг/кг ингибирует внутрибрюшинный рост опухоли OVCAR3/luc in vivo. Если не указано иное, биоллюминесцентное излучение относится к [ф/с/см<sup>2</sup>/ср].

Данное изобретение также включает анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые демонстрируют фармакокинетические профили у гуманизированных мышей MUC16 x CD3 (мышей, гомозиготных по экспрессии MUC16 и CD3 человека, MUC16<sup>hu/hu</sup> x CD3<sup>hu/hu</sup>) гуманизированных мышей CD3 (мышей, гомозиготных по экспрессии CD3 человека, CD3<sup>hu/hu</sup>) и мышей дикого типа, подобранных по линии (ДТ) (75% C57BL, 25% 129Sv), как описано в примере 7 и показано на фиг. 1, 2 и 3.

Картирование эпитопов и связанные с ним технологии.

Эпитоп на CD3 и/или MUC16, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот CD3 или белка MUC16. В альтернативном варианте, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или MUC16. Антитела по данному изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами в двух или более различных цепях CD3. Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Различные методы, известные специалистам в данной области техники, могут быть применены для определения того, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами внутри полипептида или белка.

Иллюстративные способы включают, например, рутинный анализ перекрестной блокировки, такой как описанные антитела, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., Нью-Йорк), мутационный анализ с аланиновым сканированием, анализ пептидных блотов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут быть применены такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть применен для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водород/дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общем, способ водород/дейтериевого обмена включает в себя мечение дейтерием белка интереса с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить обмен водород-дейтерия по всем остаткам, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и анализу с помощью масс-спектрометрии, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело; см., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 13: 256A-265A. Рентгеновская кристаллография комплекса антиген/антитело может также использоваться для картирования эпитопов.

Данное изобретение дополнительно включает в себя анти-MUC16 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любой из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, указанных в табл. 1 в данном документе). Аналогичным образом, данное изобретение также включает анти-MUC16 антитела, которые конкурируют за связывание с MUC16 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 1 в данном документе).

Данное изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низким или отсутствующим связыванием или аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, в котором специфически связывается с MUC16 человека, причем первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, что и любой из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или в котором второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на MUC16, что и любой из

конкретных иллюстративных MUC16-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Кроме того, данное изобретение также включает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим MUC16, в котором первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, и/или в котором второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с MUC16 с любым из конкретных иллюстративных MUC16-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе.

Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению, используя рутинные способы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на MUC16 (или CD3), что и эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула по данному изобретению, эталонной биспецифичной молекуле сначала разрешается связываться с белком MUC16 (или белком CD3). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой MUC16 (или CD3). Если тестируемое антитело способно связываться с MUC16 (или CD3) после связывания насыщением с эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом MUC16 (или CD3), чем эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой MUC16 (или CD3) после связывания насыщением с эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом MUC16 (или CD3) в качестве эпитопа, связанного эталонной биспецифичной антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению. Затем может быть проведено дополнительное обычное исследование (например, пептидная мутация и анализ связывания), для подтверждения, является ли наблюдаемое недостаточное связывание тестируемого антитела на самом деле связанным со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, или является ли пространственное блокирование (или другое явление) ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа могут быть выполнены с применением ИФА, РИА (радиоиммунологического анализа), Вiascore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990: 50: 1495-1502). Альтернативно, считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонной антигенсвязывающей молекуле позволено связывать белок MUC16 (или белок CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой MUC16 (или CD3). Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой MUC16 (или CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой MUC16 (или CD3). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой MUC16 (или CD3), то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с MUC16 (или CD3). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифичных молекул.

Антигенсвязывающие домены, специфичные для конкретных антигенов, могут быть получены с помощью любой технологии генерирования антител, известной в данной области техники. После получения, два разных антигенсвязывающих домена, специфичных для двух разных антигенов (например, CD3 и MUC16), могут быть соответствующим образом расположены относительно друг друга для получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению с использованием рутинных способов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифичных антител, которые можно

использовать для конструирования биспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, приводится в другом месте данного документа). В определенных вариантах осуществления изобретения, один или более отдельных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей биспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению можно получить с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии, генерирующей человеческие антитела) химерные антитела с высоким сродством к конкретному антигену (например, CD3 или MUC16) первоначально выделяют, имея вариабельный участок человека и константный участок мыши. Антитела характеризуются и отбираются по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные участки мыши заменяются желаемым константным участком человека для генерации полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению.

Генетически сконструированные животные могут быть использованы для получения человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул. Например, может быть использована генетически модифицированная мышь, которая не способна реорганизовывать и экспрессировать вариабельную последовательность легкой цепи эндогенного иммуноглобулина мыши, причем мышь экспрессирует только один или два вариабельных домена легкой цепи человека, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с константным геном каппа мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Такие генетически модифицированные мыши могут быть использованы для получения полностью человеческих биспецифичных антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух различных генных сегментов вариабельного участка легкой цепи человека. (См., например, US 2011/0195454). Термин "полностью человеческий" относится к антителу, или антигенсвязывающему фрагменту, или его домену иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из человеческой последовательности, по всей длине каждого полипептида антитела или антигенсвязывающего фрагмента или домена его иммуноглобулина. В некоторых случаях полностью человеческая последовательность происходит из белка, эндогенного для человека. В других случаях полностью человеческий белок или белковая последовательность содержит химерную последовательность, причем каждая компонентная последовательность получена из человеческой последовательности. Не будучи связанными какой-либо одной теорией, химерные белки или химерные последовательности обычно предназначены для минимизации образования иммуногенных эпитопов в соединениях последовательностей компонентов, например, по сравнению с любыми участками или доменами человеческого иммуноглобулина дикого типа.

#### Биоэквиваленты.

Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных в данном документе иллюстративных молекул, но которые сохраняют способность связывать CD3 и/или MUC16. Такие варианты молекул могут содержать одну или более вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных биспецифичных антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые являются биоэквивалентными любым из приведенных в качестве примера антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не проявляют существенной разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе, так и многократной дозе. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, являются не существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства, например, при хроническом применении, и считаются с медицинской точки зрения незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте реализации данного изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между эталонным препаратом и биологическим препаратом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенную эффективность по сравнению с про-

должающейся терапией без такого переключения.

В одном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными и достоверно прогнозирует данные биодоступности у человека *in vivo*; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, у которых соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифичных антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не необходимых для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, с целью предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифичных антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Селективность видов и перекрестная реактивность видов В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека, но не с CD3 от других видов. Также предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с MUC16 человека. Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и с CD3 одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с MUC16 человека.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления изобретения, предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и/или MUC16 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или более CD3 и/или MUC16 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, резуса или шимпанзе. Например, в конкретном примере осуществления данного изобретения предложены биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает MUC16 человека.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC).

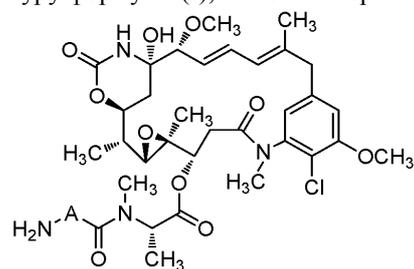
Данное изобретение обеспечивает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с терапевтической молекулой, такой как цитотоксический агент, химиотерапевтический препарат, иммунодепрессант или радиоизотоп. В общих чертах, ADC содержит: A - [L - P]<sub>n</sub>, где A представляет собой антигенсвязывающую молекулу, например, анти-MUC16 антитело или его фрагмент (например, фрагмент, содержащий по меньшей мере HCDR3, выбранный из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1), L представляет собой линкер, P представляет собой полезную нагрузку или терапевтическую часть (например, цитотоксический агент), а n представляет собой целое число от 1 до 30. В различных вариантах осуществления изобретения, ADC содержит анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит CDR HCVR и LCVR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2 и 10) перечисленные в табл. 1, или конкретные пары HCVR/LCVR (например, SEQ ID NO: 2/10). В некоторых случаях анти-MUC16 антитело или его фрагмент содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16), приведенными в табл. 1. В некоторых случаях анти-MUC16 антитело или его фрагмент содержит HCVR и LCVR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2 и 10), представленные в табл. 1, или пары конкретных аминокислотных последовательностей (например, SEQ ID NO: 2/10). В некоторых случаях анти-MUC16 антитело представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с MUC16 человека в одном или более из пяти мембранно-проксимальных доменов SEA MUC16 человека, соответствующих остаткам 13791-14451 SEQ ID NO: 1899. В некоторых случаях анти-MUC16 антитело представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с MUC16 человека в остатках 13810-14451 SEQ ID NO: 1899. В некоторых случаях анти-MUC16 антитело представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с любым из нескольких SEA1, SEA2, SEA3, SEA4, SEA5, SEA6, SEA7, SEA8,

SEA9, SEA10, SEA11, SEA12, SEA13, SEA14, SEA15 или SEA16 MUC16 человека.

Цитотоксические агенты включают любой агент, который является вредным для роста, жизнеспособности или размножения клеток. Антигенсвязывающие молекулы или антитела по данному изобретению доставляют эти цитотоксические агенты, называемые в данном документе "полезными нагрузками", в клетки-мишени. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования ADC известны в данной области техники.

Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов, которые могут быть конъюгированы с анти-MUC16 антителами в соответствии с этим аспектом данного изобретения, включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2 диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диен-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-амин-камптотецин, актиномицин D, аманидины, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (АМС), ауристатины (монометилловый ауристин Е или монометил ауристин F), блеомицин, бисульфат, масляную кислоту, калихеамицины, камптотецин, карминомицин, кармустин, кемадотины, цисплатин, колхицин, комбретастатины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин В, дактиномицин, даунорубин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубин, дибромоманнитол, дигидрокси антрацин диона, дисоразолы, доластин, доксорубин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эсперамицин, эстрамустины, бромид этидия, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, лептомицины, лейрозины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтансиноиды, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомин, митоксантрон, N8-ацетил спермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пиромидин, ризоксины, стрептозотоцин, таллисомицины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиюэпа хлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины, и производные любого из вышеперечисленного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, цитотоксический агент, который конъюгирован с анти-MUC16 антителом является ауристатином, таким как монометилловый Ауристин Е (ММАЕ) или монометилловый Ауристин F (ММАF), тубулизином, таким как TUB-OH или TUB-OMOM, производным томаймицина, производным доластатина или мейтансиноида, таким как DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент представляет собой мейтансиноид, имеющий структуру формулы (I), включая стереоизомеры соединений формулы (I):



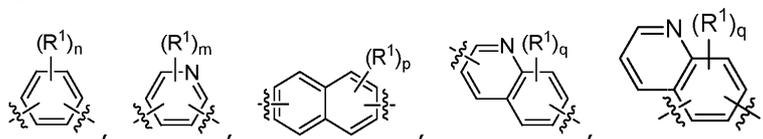
(Формула I)

где А представляет собой арилен или гетероарилен.

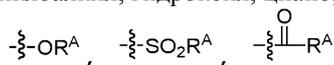
В некоторых вариантах осуществления изобретения, А представляет собой двухвалентный радикал бензола, пиридина, нафталина или хинолона, которые необязательно замещены.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, А представляет собой арилен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, А представляет собой:



где R<sup>1</sup> независимо представляет собой в каждом случае алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил, аралкил, галоген, гетероарил, гетероциклоалкил, гидроксил, циано, нитро,



или азидо,

где R<sup>A</sup> представляет собой алкил или гетероалкил;

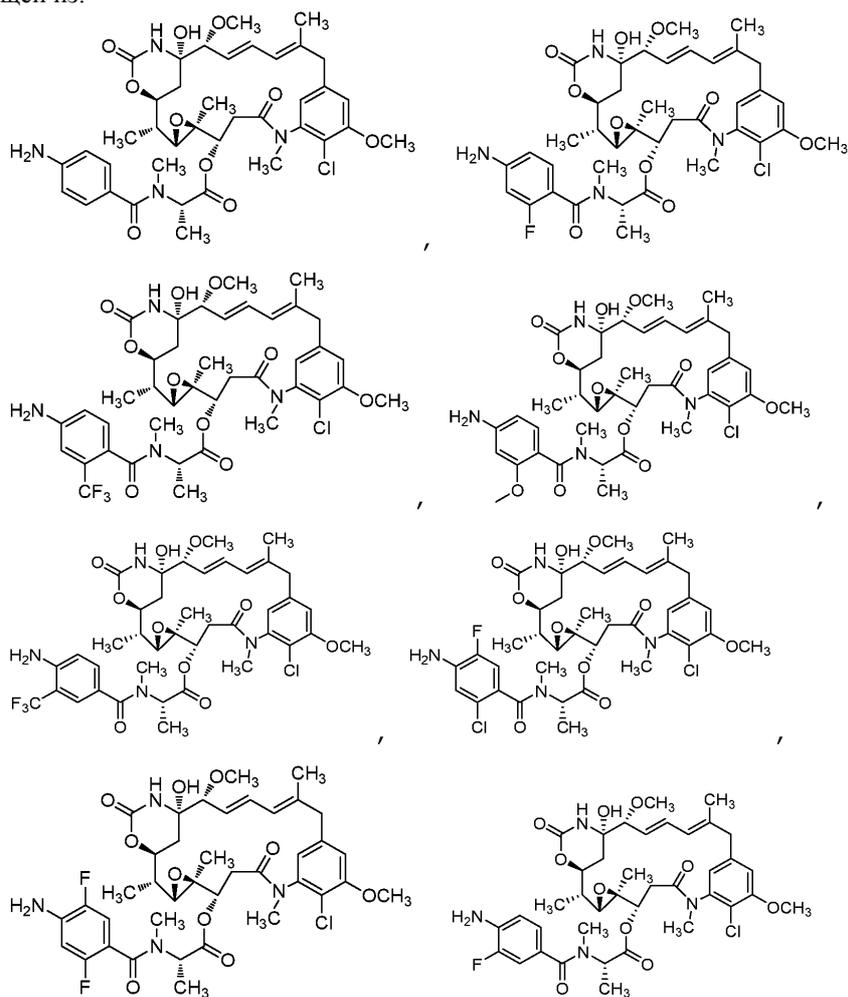
n представляет собой целое число от 0 до 4;

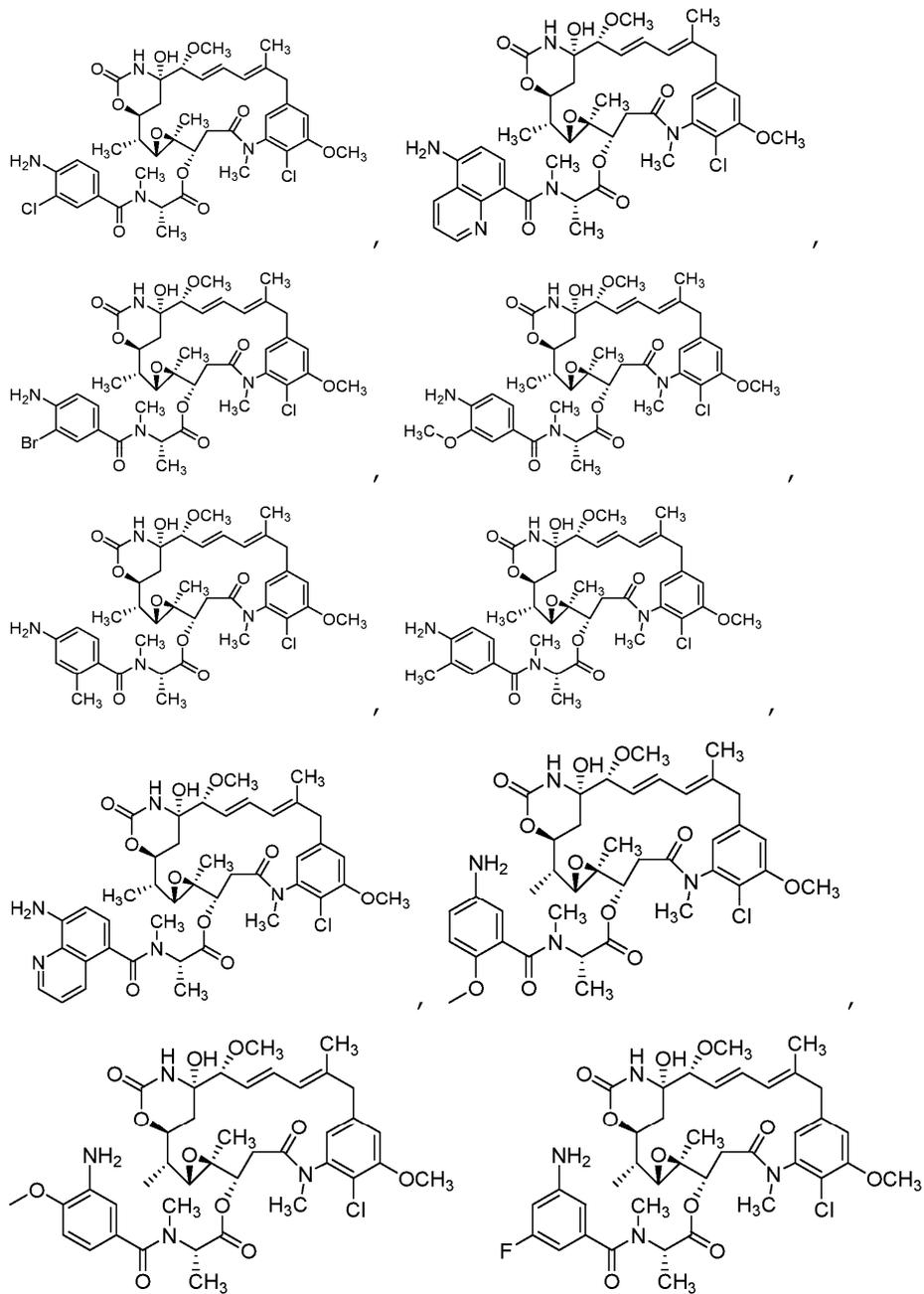
m представляет собой целое число от 0 до 3;

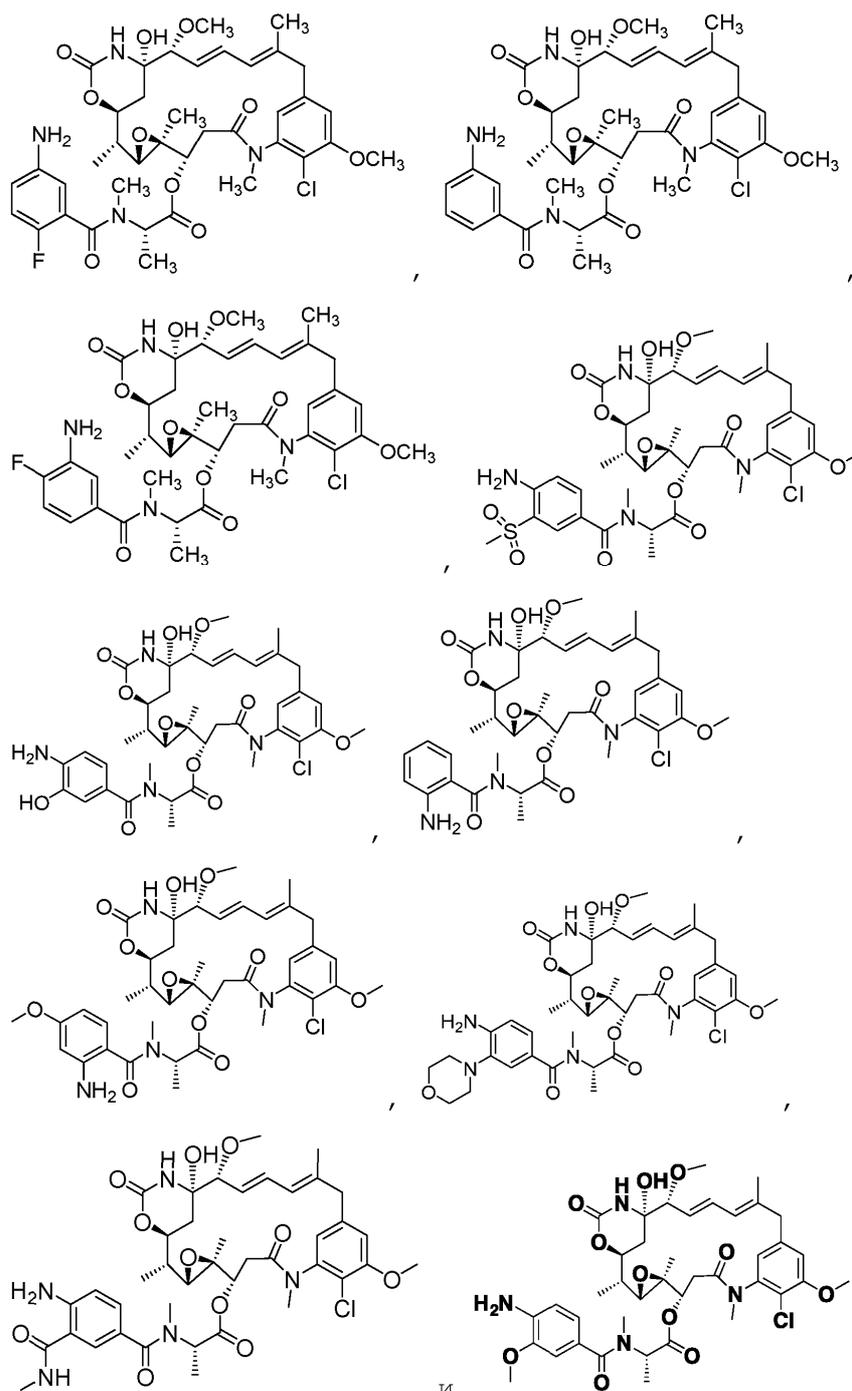
p представляет собой целое число от 0 до 6; и

q представляет собой целое число от 0 до 5.

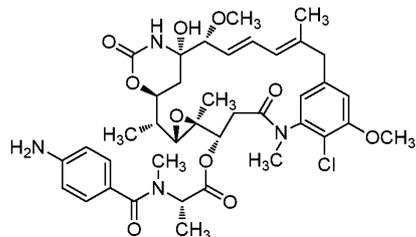
В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соединение формулы I выбирают из группы, состоящей из:



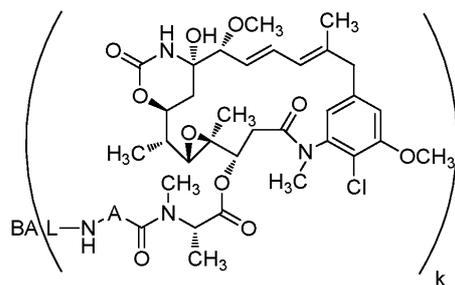




В одном варианте осуществления изобретения, соединение формулы (I) представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления изобретения, мейтансиноид формулы (I) конъюгируют с анти-MUC16 антителом или антигенсвязывающем фрагментом через линкер, как показано в формуле (IA), ниже:



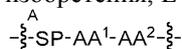
(Формула IA)

где A представляет собой арилен или гетероарилен, как обсуждалось выше в связи с формулой (I); L представляет собой линкер;

VA представляет собой анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

k представляет собой целое число от 1 до 30.

В различных вариантах осуществления изобретения, L представляет собой:



где SP представляет собой спейсер;

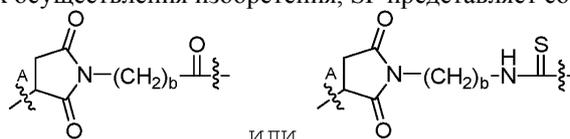


представляет собой одну или более связей с анти-MUC16 антителом или его фрагментом;

AA<sup>1</sup> представляет собой аминокислоту; и AA<sup>2</sup> представляет собой аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, AA<sup>1</sup>-AA<sup>2</sup> представляет собой: валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, аспарагин-треонин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин или аспарагин-аланин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, SP представляет собой:

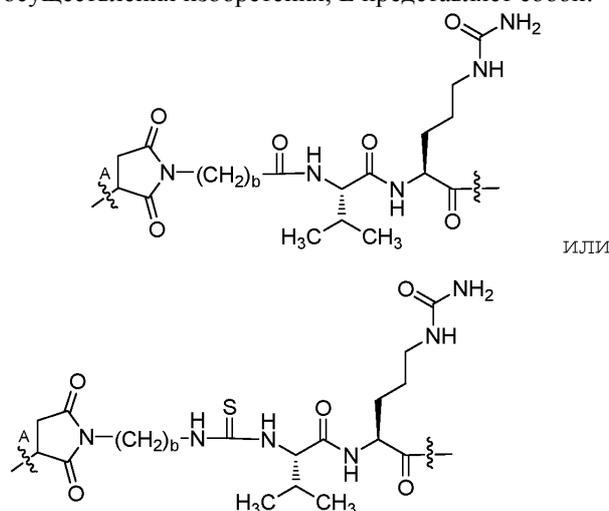


ИЛИ

где  $\text{---} \overset{\text{A}}{\underset{\text{A}}{\text{S}}} \text{---}$  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом;

b представляет собой целое число от 2 до 8.

В других вариантах осуществления изобретения, L представляет собой:

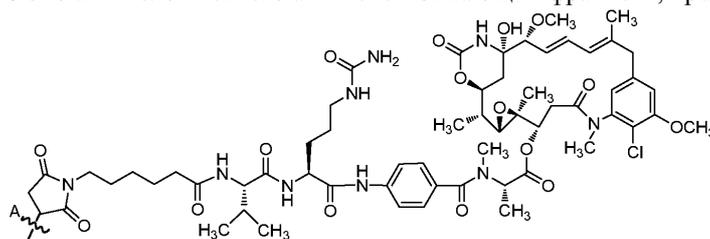


ИЛИ

где  $\text{---} \overset{\text{A}}{\underset{\text{A}}{\text{S}}} \text{---}$  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом;

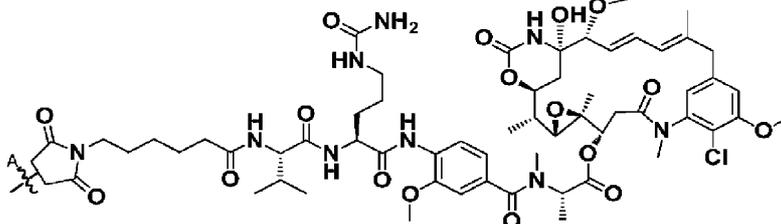
b представляет собой целое число от 2 до 8.

В одном варианте осуществления изобретения, соединение формулы (IA), включая линкер, который связывается с анти-MUC16 антителом или его антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой:



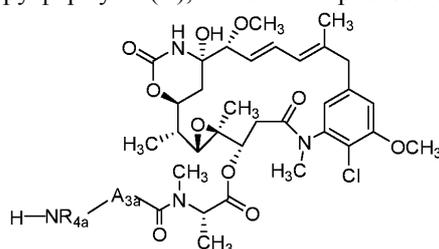
где  $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{S}}\text{---}$  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях этот фрагмент называют "Соединением 10".

В одном варианте осуществления изобретения, соединение формулы (IA), включая линкер, который связывается с анти-MUC16 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



где  $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{S}}\text{---}$  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях этот фрагмент называют "Соединением 60".

В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент представляет собой мейтансиноид, имеющий структуру формулы (II), включая стереоизомеры соединений формулы (II):



(Формула II)

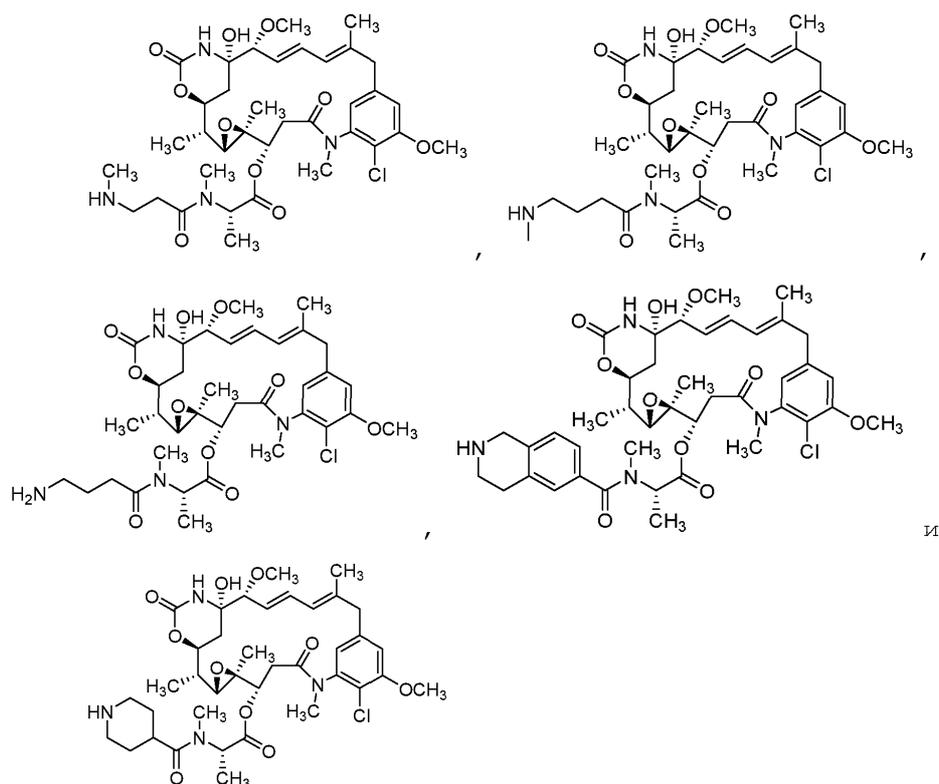
где  $A_{3a}$  представляет собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил,  $-\text{CR}_5\text{R}_6-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{p1}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_{p1}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$ ,  $((\text{CH}_2)_{p2}-\text{O})_{p3}-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{NR}_4-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$  или  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4-$ , где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил необязательно замещены; и  $p1$ ,  $p2$  и  $p3$ , каждый независимо, равен 0 или целому числу от 1 до 100;

$x$  равен 0, 1 или 2;

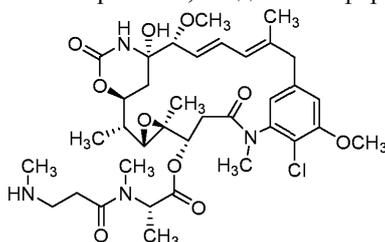
$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_8$ , каждый независимо, представляют собой H или замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил; и

$R_{4a}$  представляет собой замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил.

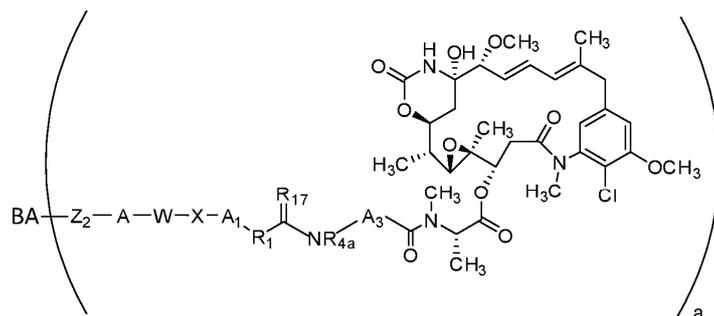
В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соединение формулы (II) выбирают из группы, состоящей из:



В одном варианте осуществления изобретения, соединение формулы (II), представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления изобретения, мейтансиноид формулы (II), конъюгируют с анти-MUC16 антителом или антигенсвязывающим фрагментом через линкер, как показано в формуле (IIA), ниже:

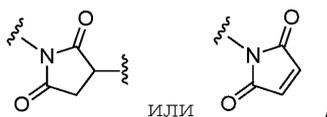


(Формула IIA)

где BA представляет собой анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

а представляет собой целое число от 1 до 30;

$Z_2$  представляет собой следующую структурную формулу:  $-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}$ , где в каждом  $Z_{2A}$ ,  $Z_{2B}$ ,  $Z_{2C}$  и  $Z_{2D}$  независимо отсутствуют, аминокислота, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероцикл,  $-\text{CR}_3\text{R}_6-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{p1}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_{p1}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}$ ,  $-((\text{CH}_2)_{p2}-\text{O})_{p3}$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{NR}_4-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ,  $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ,  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ,



A представляет собой природную или не природную аминокислоту или пептид, содержащий 2-20 аминокислот;

W представляет собой -O-, -S-, -CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub> - или -NR<sub>4</sub>-;

X представляет собой арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклил, где арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены;

где A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> и R<sub>1</sub>, каждый независимо, представляют собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил, -CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH<sub>x</sub>)<sub>p1</sub>-, -C(=O)-O-(CH<sub>x</sub>)<sub>p1</sub>-, -(CH<sub>x</sub>)<sub>p1</sub>-C(=O)-, -(CH<sub>x</sub>)<sub>p1</sub>-C(=O)-O-, -(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>)<sub>p3</sub>-, -((CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-O)<sub>p3</sub>-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -S-C(=S)-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -NR<sub>4</sub>-, -N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-N(R<sub>8</sub>)-, -N(R<sub>4</sub>)-C(=O)O-, -N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-, -C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-C(=O) - или -O-C(=O)-NR<sub>4</sub>-, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил необязательно замещены;

R<sub>17</sub> выбран из группы, состоящей из O, S, NR<sub>18</sub> и CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>;

R<sub>18</sub> выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкинила, алкенила, циклоалкила, арила, гетероарила, гетероциклила и ацила, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил и ацил необязательно замещены;

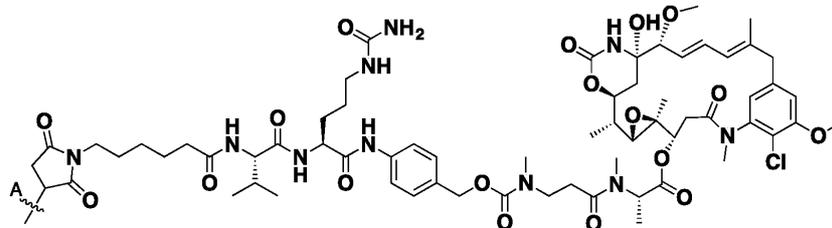
R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>8</sub>, каждый независимо, представляют собой H или замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил;

R<sub>4a</sub> является замещенным или незамещенным: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил;

p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub> и p<sub>3</sub>, каждый независимо, равен 0 или целому числу от 1 до 100; и x равен 0, 1 или 2.

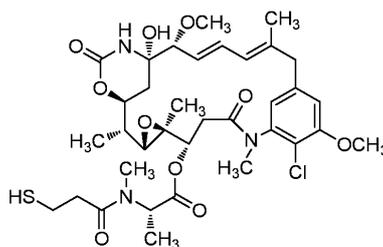
В некоторых вариантах осуществления формулы (IIA), A представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина, цитруллина-валина, лизина-фенилаланина, фенилаланина-лизина, валина-аспарагина, аспарагина-валина, треонина-аспарагина, аспарагина-треонина, серина-аспарагина, аспарагина-серина, фенилаланина-аспарагина, аспарагина-фенилаланина, лейцина-аспарагина, аспарагина-лейцина, изолейцина-аспарагина, аспарагина-изолейцина, глицина-аспарагина, аспарагина-глицина, глутаминовой кислоты-аспарагина, аспарагина-глутаминовой кислоты, цитруллина-аспарагина, аспарагина-цитруллина, аланина-аспарагина и аспарагина-аланина.

В одном варианте осуществления изобретения, соединение формулы (IIA), которая связывается с анти-MUC16 антителом или антигенсвязывающим фрагментом является следующим:



где  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях этот фрагмент называют "Соединением 7".

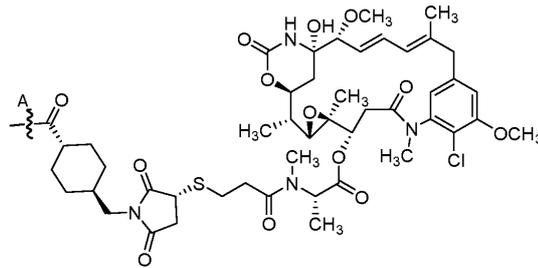
В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент, который конъюгируют с анти-MUC16 антителом или его фрагментом является чистым, или по существу чистым, диастереомером DM1:



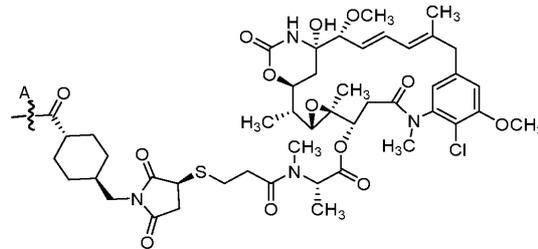
(DM1)

и у представляет собой целое число от 1 до 0.

В другом варианте осуществления изобретения, ADC содержит "A - [L - P]<sub>y</sub>" структуру, в которой A представляет собой анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и [L - P] представляет собой:



, или



или их смесь, и где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 30, и  $A$  представляет собой связь с анти-MUC16 антителом или его фрагментом.

Другие производные мейтансиноида описаны в WO 2014/145090, WO2016/160615, WO 2015/031396 и, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитотоксический агент, который конъюгирует с анти-MUC16 антителом или его фрагментом является MMAEM или MMAF.

Другие цитотоксические агенты, известные в данной области техники в пределах объема данного изобретения, в том числе, например, белковые токсины, такие как рицин, токсин *C. difficile*, экзотоксин *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, ботулинический токсин, бриодин, сапорин, токсины лакноса (то есть фитолактотоксин и фитолактигенин) и другие, такие как те, которые описаны в Sapra et al., *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138: 452-469.

Цитотоксические агенты ("полезные нагрузки") могут быть связаны с анти-MUC16 антигенсвязывающей молекулой или антителом по данному изобретению через химический линкер, который ковалентно связывает соединение полезной нагрузки с молекулой белка (т.е. антителом). Иллюстративные варианты осуществления конкретных линкеров обсуждаются выше. В более общем смысле и используемый в данном документе термин "линкер" относится к любой двухвалентной группе или фрагменту, который связывает, соединяет или связывает связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) с указанным соединением полезной нагрузки в данном документе. Как правило, подходящие линкеры связывающего агента для конъюгатов антител, описанных в данном документе, представляют собой те, которые являются достаточно стабильными, чтобы использовать циркулирующий период полужизни антитела, и в то же время способны высвобождать его полезную нагрузку после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомальной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, кислотнo-лабильные линкеры, гидролизно-лабильные линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, восстанавливающие лабильные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, но не ограничиваются ими, те, которые являются ими или содержат пептиды, глюкуроны, сукцинимид-тиоэферы, полиэтиленгликолевые (ПЭГ) единицы, гидразоны, маль-капроильные единицы, дипептидные единицы, валин-цитруллиновые единицы и парааминобензил (РАВ) единицы. В некоторых случаях линкер способен связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через остаток лизина или остаток цистеина (например, посредством расщепления дисульфидной группы антитела или фрагмента, или через остаток цистеина, встроенный в антитело или фрагмент). В некоторых случаях линкер способен связываться с антителом или фрагментом через остаток глутамина, в том числе полученный трансглутаминаз-опосредованной конъюгацией.

Иллюстративные линкеры, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, включают линкеры, которые содержат или состоят из, например, МС (6-малеимидокапроил), МСС (малеимидометил циклогексан-1-карбоксилат), МР (малеимидопропаноил), val-cit (валин-цитруллин), val-ala (валин-аланин), ala-phe (аланин-фенилаланин), phe-lys (фенилаланин-лизин), сайт дипептида в расщеп-

ляемом протеазой линкере, PAB (п-аминобензилоксикарбонил), SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат), SMCC(N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил (4-йод-ацетил)аминобензоат) и их варианты и комбинации.

Дополнительные примеры линкеров, которые можно использовать в контексте данного изобретения, описаны, например, в патенте США № 7754681 и в Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 21: 5-13, и цитированных там ссылках, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. В некоторых случаях линкер представляет собой или содержит саморасщепляющийся спейсер, такой как обсуждаемые в Jin, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20: 3465-3469, и Wu, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24: 2697-2706.

Полезная нагрузка может быть связана с анти-MUC16 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с помощью вложений в конкретных аминокислотах в пределах антитела или антигенсвязывающей молекулы. Иллюстративные аминокислотные присоединения, которые можно использовать в контексте этого аспекта изобретения, включают, например, лизин (см., например, патент США № 5208202; US 2010/0129314; Hollander et al., Bioconjugate Chem., 2008), 19: 358-361; WO 2005/089808; патент США № 5714586; US 2013/0101546 и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и патент США № 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105: 12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico et al., Nat. Chem. Biol., 2007, 3: 321-322; Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 2013, 110: 46-51, и Rabuka et al., Nat. Protocols, 2012, 10: 1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497 и Ryan et al., Food & Agriculture Immunol., 2001, 13: 127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak et al., Nat. Chem. Biol., 2006, 2: 312-313).

Отношение лекарственное средство-антитело (DAR) представляет собой среднее число лекарственных средств, конъюгированных с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которое оказывает важное влияние на эффективность, активность и фармакокинетику ADC. В различных вариантах осуществления изобретения, DAR составляет от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 молекул лекарственного средства на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, DAR составляет от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления изобретения, DAR составляет от 2 до 4. В некоторых случаях DAR составляет от 2 до 3. В некоторых случаях DAR составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, DAR составляет от 1 до 10, от 1 до 20 или от 1 до 30 (то есть от 1 до 30 молекул лекарственного средства на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

Терапевтическая формула и введение.

Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению. Фармацевтические композиции по данному изобретению состоят с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в рецептурном формуляре, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид (катионный или анионный), содержащий везикулы (такие как LIPOFECTIN™ Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс; см., также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда биспецифичная антигенсвязывающая молекула по данному изобретению используется в терапевтических целях у взрослого пациента, может быть выгодно внутривенно вводить биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по данному изобретению обычно в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы могут быть определены опытным путем; например, прогресс пациента может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут быть применены для введения фармацевтической композиции по данному изобретению, например, инкапсулирования в липосомы, микрочастицы, микро-

капсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и оральные пути введения. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную и кишечную слизистую оболочку и тому подобное) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно стандартной иглой и шприцем. Кроме того, в отношении подкожной доставки шприц-ручка для доставки легко может иметь применение для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. Многоразовая шприц-ручка обычно использует сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция, содержащаяся в картридже, была введена и картридж становится пустым, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть повторно использована. В одноразовой шприц-ручке нет сменного картриджа. Скорее, одноразовая шприц-ручка заполняется фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опустеет от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные повторно используемые шприц-ручки и шприц-тюбики имеют применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, но без ограничений, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, штат Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприц-ручек, которые применяются для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, но без ограничений, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может поставляться в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления изобретения, может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201). В другом варианте осуществления изобретения, могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида. В еще одном варианте осуществления изобретения, система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, таким образом требуется лишь доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и тому подобного. Эти инъекционные формы могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные формы, могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации с соответствующим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)] и тому подобное. В качестве маслянистой среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации со солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и тому подобное. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно, заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственной форме в единичной дозе, подходящей для дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и тому подобное. Количество содержащегося вышеупомянутого антигена обычно составляет от 5 до 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в

форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое использование антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает в себя способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом терапевтической композиции, содержащей анти-MUC16 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которые специфически связываются с CD3 и MUC16. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Используемое в данном документе, выражение "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или животное, отличное от человека, которые проявляют один или более симптомов или признаков рака (например, субъект, экспрессирующий опухоль или страдающий от любого из видов рака, упомянутых в данном документе ниже), или кому в противном случае было бы полезно ингибирование или снижение активности MUC16 или истощении клеток MUC16+ (например, клеток рака яичников).

Антитела и биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению (и терапевтические композиции, содержащие то же) полезны, в частности, для лечения любого заболевания или расстройства, при которых стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа было бы полезным. В частности, анти-MUC16 антитела или анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичные антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут быть использованы для лечения, профилактики и/или улучшения любого заболевания или расстройства, связанных или опосредованных экспрессией MUC16 или активностью, или пролиферацией клеток MUC16+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по данному изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих MUC16, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством КЗЦ, апоптоза, АЗКЦ, фагоцитоза или путем комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие MUC16, которые можно ингибировать или уничтожить с использованием биспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, включают, например, клетки рака яичника.

Антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут быть использованы для лечения заболевания или расстройства, ассоциированных с экспрессией MUC16, включая, например, рак, включающий рак яичника, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутриспеченочную холангиокарциному массообразующего типа, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения анти-MUC16 антитела или анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичные антитела полезны для лечения пациента, страдающего раком яичника. Согласно другим связанным вариантам осуществления изобретения предложены способы, включающие введение анти-MUC16 антитела или анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, как описано в данном документе, пациенту, страдающему раком яичника.

Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т.д., могут быть использованы для определения того, имеет ли пациент опухоль яичника.

Данное изобретение также относится к способам лечения остаточного рака у субъекта. Используемый в данном документе термин "остаточный рак" означает наличие или персистенцию одной или более раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией.

В соответствии с некоторыми аспектами, данное изобретение относится к способам лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией MUC16 (например, рака яичника), включающим введение одной или более из анти-MUC16 или биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте данного документа субъекту после того, как было определено, что субъект имеет рак предстательной железы. Например, данное изобретение включает способы лечения рака яичника, включающие введение анти-MUC16 антитела или анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичной антигенсвязывающей молекулы пациенту через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

Комбинированная терапия и составы.

Данное изобретение относится к способам, которые включают в себя введение фармацевтической композиции, содержащей любое из приведенных в качестве примера антител и биспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению, включают, например, антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R

антитело), B-raf ингибитор (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- $\alpha$  (например, анти-PDGFR- $\alpha$  антитело), ингибитор PDGFR- $\beta$  (например, анти-PDGFR- $\beta$  антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-ловушка, см., например, US 7087411, (также называемый в данном документе "VEGF-ингибирующий слитый белок"), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, описанное в US 2009/0142354 такой как REGN421), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, описанное в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (PSMA), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMPRSS2 (например, анти-TMPRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, анти-уроплакин антитело) и др. Другие агенты, которые можно выгодно вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами по данному изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18 или их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции по данному изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие анти-CD3/анти-MUC16 биспецифичную антигенсвязывающую молекулу, как описано в настоящем документе) также можно вводить как часть терапевтического режима, содержащего одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из "ICE": ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозинарабинозид, ara-C), цисплатин (например, Platinol®-AQ); и "ESHAP": этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), высокие дозы цитарабина, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

Данное изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, D114, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакин или любой из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное тело, нанотело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb) или другие сконструированные молекулы, например, диатела, триантела, тетрабела, минитела и минимальные единицы распознавания). Антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или NSAID. Антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или обычную химиотерапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению; (для целей данного изобретения такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Данное изобретение включает в себя фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула по данному изобретению совместно составляется с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентом(ами), как описано в данном документе в другом месте.

#### Схемы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-MUC16 антитело или биспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывается с MUC16 и CD3) может вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы по этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению. Применяемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антигенсвязывающей молекулы вводится субъекту в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное изобретение включает способы, которые включают в себя последовательное введение пациенту единственной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, за которой следуют одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы, и необязательно сопровождаемая одной или более третичными дозами антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале курса лечения (также называемая "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одно и то же количество антигенсвязывающей молекулы, но обычно могут

отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в определенных вариантах реализации данного изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальных, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, скорректировано вверх или вниз по мере необходимости) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале курса лечения в качестве "насыщающих доз" с последующими дозами, которые вводятся менее часто (например, "поддерживающие дозы").

В одном иллюстративном варианте реализации данного изобретения каждую вторичную и/или третью дозу вводят через от 1 до 26 недель (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> и более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", как она применяется в данном документе, означает, в последовательности множественных введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-MUC16 антитела или биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с MUC16 и CD3). Например, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводится только одна вторичная доза. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводится только одна третичная доза. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления с участием нескольких вторичных доз, каждая вторичная доза может быть введена в той же частоте, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления изобретения, включающих множество третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе курса лечения лечащим врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Диагностическое применение антител.

Анти-MUC16 антитела по данному изобретению также могут быть использованы для обнаружения и/или измерения MUC16 или MUC16-экспрессирующих клеток в образце, например, биологическом образце в диагностических целях. Например, анти-MUC16 антитело или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) MUC16. Иллюстративные диагностические анализы для MUC16 могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с анти-MUC16 антителом по данному изобретению, причем анти-MUC16 антитело мечено обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте, немеченое анти-MUC16 антитело может применяться в диагностических применениях в сочетании со вторичным антителом, которое само по себе является меченым для детекции. Детектируемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, или <sup>125</sup>I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другое иллюстративное диагностическое применение анти-MUC16 антител по данному изобретению включает <sup>89</sup>Zr-меченное, такое как <sup>89</sup>Zr-десферриоксамин-меченное, антитело с целью неинвазивной идентификации и отслеживания опухолевых клеток у субъекта [например, визуализация позитронно-эмиссионной томографии (PET) (см., например, Tavaré, R. et al. *Cancer Res* 2016 1 января; 76 (1):.. 73-82, и Azad, B.V. et al. *Oncotarget*. 2016 Mar 15; 7(11) :12344-58). Конкретные типовые анализы, которые могут быть применены для обнаружения или измерения MUC16 в образце, включают в себя иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS - fluorescence-activated cell sorting).

Образцы, которые могут применяться в MUC16 диагностических анализах в соответствии с данным изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, который можно получить от пациента, который содержит определяемые количества белка MUC16 или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни MUC16 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью MUC16) будут измеряться с целью первоначального установления исходного уровня или стандартного уровня MUC16. Этот базовый уровень MUC16 можно затем сравнить с уровнями MUC16, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, подозреваемых в наличии заболевания, связанного с MUC16 (например, опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие MUC16) или состояния.

Примеры образцов ткани или жидкости включают, но не ограничиваются ими, плазму, сыворотку, асцит, яичник, матку, шейку матки, печень, мочевой пузырь, поджелудочную железу, желудок, тонкую или толстую кишку, желчный пузырь, грудь, легкое, почку, слюнные железы, и слезные железы или любое их злокачественное эпителиоидное образование. Дополнительные примеры ткани или образцов жидкости, включают, но не ограничиваются ими папиллярный серозный рак шейки матки, аденокарциному эндометрия, светлоклеточную аденокарциному мочевого пузыря, карциному семенных пузырьков, карциному желудка, колоректальную аденокарциному и эпителиоидную мезотелиому. Предполагается, что любой образец жидкости или ткани, который содержит обнаруживаемые количества белка MUC16 или его фрагментов, может быть подвергнут способам обнаружения, описанным в данном документе. Описанные способы могут использоваться для мониторинга развития и прогрессирования злокачественных заболеваний или для различения нормальных и болезненных состояний. Как таковые, описанные способы могут быть использованы для выявления или мониторинга раковых заболеваний, таких как рак яичников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутривенную холангиокарциному массивообразующего типа, аденокарциному шейки матки, и аденокарциному желудочного тракта.

### Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как производить и применять способы и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и тому подобное), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Получение анти-MUC16 антител.

Анти-MUC16 антитела получают путем иммунизации генетически модифицированной мыши с человеческим антигеном MUC16 или иммунизации сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующей человеческий иммуноглобулин тяжелой и легкой цепи переменных участков с человеческим антигеном MUC16.

Генетически модифицированные мыши были иммунизированы hMUC16.nub (усеченный формат, охватывающий последние пять SEA доменов муцина-16 (SEQ ID: 1902)), либо иммунизированы hMUC16-экспрессирующей клеточной линией, такой как клетки OVCAR-3. SEQ ID NO: 1902 содержит остатки 13810-14451 SEQ ID NO: 1899, а также С-концевые метки. После иммунизации спленоциты собирали у каждой мыши и (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования клеток гибридомы и скринировали на специфичность к MUC16, или (2) отсортировали В-клетки (как описано в US 2007/0280945A1) используя фрагмент MUC16 человека в качестве сортирующего реагента, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-позитивные В-клетки).

Химерные антитела к MUC16 первоначально были изолированы, имели переменный участок человека и константный участок мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т.д. При необходимости константные участки мыши были заменены желаемым константным участком человека, например, константным участком дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, для генерации полностью человеческого анти-MUC16 антитела. Несмотря на то, что выбранный константный участок может варьироваться в зависимости от конкретного применения, переменный участок обеспечивает высокоаффинные антигенсвязывающие и специфичные к цели характеристики. Обозначения названий антител, такие как H1H8755P и H1M7129N, обозначают полностью человеческие антитела "H1H" или химерные переменный человек/константный мыши участки антител "H1M". Антитела, идентифицированные гибридным способом, обозначены идентификационными номерами антител, заканчивающимися на "N" или "N2". Антитела, идентифицированные способом сортировки В-клеток, обозначены идентификационными номерами антител, заканчивающимися на "P" или "P2".

Некоторые биологические свойства иллюстративных анти-MUC16 антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, приведенных ниже.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот переменного участка тяжелой и легкой цепей анти-MUC16 антител.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных участков и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных анти-MUC16 антител по данному изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

## Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H8767P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H8770P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H8783P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H8790P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H8794P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H8794P2	82	84	86	88	858	860	862	864
H1H8799P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H8799P2	98	100	102	104	170	172	174	176
H1H8804P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H8808P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H8810P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H8813P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1M7129N	178	180	182	184	186	188	190	192
H1M7137N	194	196	198	200	394	396	398	400
H1M9519N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M9521N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M9528N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M7128N	250	252	254	256	1936	1938	1940	1942
H1M7130N	1944	1946	1948	1950	1952	1954	1956	1958
H2M7131N	258	260	262	264	266	268	270	272
H2M7133N	274	276	278	280	1936	1938	1940	1942
H2M7134N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M7135N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M7138N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M9538N	330	332	334	336	338	340	342	344
H3M9524N	346	348	350	352	354	356	358	360
H3M9525N	362	364	366	368	370	372	374	376
H3M9529N	378	380	382	384	386	388	390	392

Таблица 2

## Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H8767P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H8770P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H8783P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H8790P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H8794P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H8794P2	81	83	85	87	857	859	861	863
H1H8799P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H8799P2	97	99	101	103	169	171	173	175
H1H8804P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H8808P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H8810P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H8813P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1M7129N	177	179	181	183	185	187	189	191
H1M7137N	193	195	197	199	393	395	397	399
H1M9519N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M9521N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M9528N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M7128N	249	251	253	255	1935	1937	1939	1941
H1M7130N	1943	1945	1947	1949	1951	1953	1955	1957
H2M7131N	257	259	261	263	265	267	269	271
H2M7133N	273	275	277	279	1935	1937	1939	1941
H2M7134N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M7135N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M7138N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M9538N	329	331	333	335	337	339	341	343
H3M9524N	345	347	349	351	353	355	357	359
H3M9525N	361	363	365	367	369	371	373	375
H3M9529N	377	379	381	383	385	387	389	391

Пример 2. Анти-MUC16 антитела специфически связываются с эндогенно экспрессируемым hMUC16 на клеточной линии OVCAR-3.

Способность анти-MUC16 антител связываться специфически с эндогенно экспрессирующимися MUC16 на линии клеток карциномы яичников человека (OVCAR-3) оценивали с помощью анализа обнаружения на основе электрохемилюминесценции (Мезо Шкала обнаружения (MSD), Роквилль, Мэриленд).

Вкратце, OVCAR-3 и контрольную клеточную линию аденокарциномы яичника, SK-OV-3, которая не имеет детектируемой экспрессии hMUC16, промывали в 1xPBS с добавлением  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Irvine Scientific, Санта Ана, Калифорния), а затем инкубировали в буфере диссоциации клеток без ферментов (Millipore, Биллерика, Массачусетс) в течение 10 минут при 37°C. Отделенные клетки затем промывали один раз в 1xPBS с добавлением  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  и подсчитывали (счетчик клеток Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience, Лоуренс, Массачусетс). Приблизительно  $1,0 \times 10^4$  клеток высевали в MULTI-ARRAY 96-луночные планшеты с угольными электродами (MSD) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем неспецифические сайты связывания блокировали с помощью 2% БСА (мас./об.) в PBS в течение 1 часа

при комнатной температуре. Затем серийные разведения анти-MUC16 или контрольных антител (0,85 пМ - 50 нМ) и буферных контролей без антител добавляли к клеткам, связанным с планшетами, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Планшеты затем промывали для удаления несвязанных антител с применением устройства отмывки иммунологических планшетов AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies, Саннивилль, Калифорния). Антитела, связанные с пластиной, детектировали с помощью антитела, конъюгированного с SULFO-TAG™ анти-человеческой каппа легкой цепи (Regeneron), или антитела, конъюгированного с SULFO-TAG™ анти-мышинного IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания), в течение 1 ч при КТ. После промывки планшеты проявляли с помощью буфера считывания (MSD) в соответствии с протоколом производителя, а люминесцентные сигналы регистрировали с помощью прибора SECTOR Imager 6000 (MSD).

Интенсивность люминесценции, измеренная в относительных световых единицах (RLU), для двух клеточных линий была записана для указания интенсивности связывания каждого антитела. Отношение сигнала, обнаруженного при связывании 1,9 нМ или 16,7 нМ анти-MUC16 антитела с OVCAR-3, по сравнению с SK-OV-3 сообщалось как показатель специфичности и эффективности связывания (табл. 3).

Соотношение связывания клетками анти-Muc16 антител к эндогенной экспрессии hMUC16 OVCAR-3 по сравнению с hMUC16-негативными клеточными линиями SK-OV-3

Идентификатор антитела	Соотношение: анти-MUC16 связывание OVCAR-3/SK-OV-3	
	[Ат]: 1,9 нМ	[Ат]: 16,7 нМ
<b>Гибридома анти-Muc16 антител (H1M, H2M, H3M)</b>		
H2M7128N	59	31
H1M7129N	68	19
H2M7131N	86	37
H2M7133N	69	33
H2M7134N	68	29
H2M7135N	30	5
H1M7137N	77	29
H2M7138N	82	50
H3M7132N	89	38
H1M9519N	109	78
H1M9521N	132	107
H3M9524N	81	57
H3M9525N	137	51
H1M9528N	153	120
H3M9529N	143	99
H2M9538N	89	26
<b>Человеческие Fc анти-MUC16 антител (H1H)</b>		
H1H8755P	13	5
H1H8767P	4	NS
H1H8770P	9	3
H1H8783P	11	4
H1H8790P	8	3
H1H8794P	8	3
H1H8794P2	5	NS
H1H8799P	10	4
H1H8799P2	10	4
H1H8804P	8	3
H1H8808P	4	NS
H1H8810P	8	3
H1H8813P	11	5

H1H9519N	41	30
H1H9521N	30	28
H1H9524N	20	48
H1H9525N	4	21
H1H9528N	41	18
H1H9529N	109	74
H1H9538N	12	13
<b>Контроли</b>		
Антитело изотипического контроля mIgG1	NS	NS
Антитело изотипического контроля mIgG2a	NS	NS
Антитело изотипического контроля hIgG1	NS	NS

NS=неспецифическое - соотношение при 1,9 нМ или 16,7 нМ <2,5-кратное.

Изотипы: H1H: hIgG1; H1M: mIgG1; H2M: mIgG2; H3M: mIgG3.

Примечание: изменение в связывании соотношения интенсивности между одним и тем же антителом, экспрессируемым с Fc мыши и Fc человека, обусловлены использованием различных реагентов вторичного обнаружения SULFO-TAG.

Как видно из результатов в табл. 3, большинство анти-MUC16 антител данного изобретения связаны специфически с OVCAR-3 при обеих высокой (16,7 нМ) и низкой (1,9 нМ) концентрации антител. Антитела изотипического контроля mIgG1, mIgG2a и hIgG1 не показали специфического связывания ни с клеточной линией OVCAR-3, ни с SK-OV-3. Кроме того, существуют доказательства того, что способ является чувствительным, поскольку некоторые антитела, которые не проявляли связывания с растворимым мономерным белком MUC16 человека в анализе связывания поверхностного плазмонного резонанса (см. пример 4 ниже), продемонстрировали специфическое связывание с эндогенным человеческим MUC16, экспрессированным на клетках OVCAR-3 в этом анализе связывания на основе клеток.

Пример 3. Получение биспецифичных антител, которые связываются с клеточно-специфичными (MUC16) и CD3 яичника.

Данное изобретение обеспечивает биспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 и MUC16; такие биспецифичные антигенсвязывающие молекулы также обозначаются в данном документе как "биспецифичные анти-MUC16/анти-CD3 или анти-MUC16xCD3 молекулы". Анти-MUC16 часть биспецифичной анти-MUC16/анти-CD3 молекулы полезна для нацеливания на опухолевые клетки которые экспрессируют MUC16 (также известные как CA-125), и анти-CD3 часть биспецифичной молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание с MUC16 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (лизис клеток) целевой опухолевой клетки активированной Т-клеткой.

Биспецифичные антитела, содержащие анти-MUC16-специфический связывающий домен и анти-CD3-специфический связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методов, причем анти-MUC16 антиген-связывающий домен и анти-CD3 антигенсвязывающий домен каждый содержит разные, отличающиеся HCVR, спаренные с общим LCVR. В приведенных в качестве примера биспецифичных антителах, молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-MUC16 антитела и общей легкой цепи из анти-MUC16 антитела. В других случаях биспецифичные антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-MUC16 антитела и легкой цепи из анти-CD3 антитела или легкой цепи антитела, о которой известно, что она является разнородной или эффективно спарена с различными плечами тяжелой цепи.

Полученные биспецифичные антитела, описанные в следующих примерах, состоят из анти-CD3 связывающих плечей, имеющих различные аффинности связывания человеческого растворимого гетеродимерного hCD3  $\epsilon/\delta$  белка (как описано в примере 15, в данном документе); и MUC16 человека (см. примеры 1-2 выше). Проиллюстрированные примерами биспецифичные антитела были изготовлены, имеющими домен Fc IgG1 (BSMUC16/CD3-001, -002, 003, и -004) или модифицированный (химерный) домен

Fc IgG4 (BSMUC16/CD3-005), как изложено в публикации заявки на патент США № US20140243504A1, опубликованной 28 августа 2014 г.

Краткое описание составных частей антигенсвязывающих доменов различных анти-MUC16хCD3 биспецифичных антител, сконструированных изложено в табл. 4.

Таблица 4

Краткая информация о частях компонентов выбранных биспецифичных анти-MUC16хCD3 антител

Идентификатор биспецифичного антитела	Анти-MUC16	Анти-CD3	Общий Вариабельный участок легкой цепи
	Антигенсвязывающий домен	Антигенсвязывающий домен	
	Вариабельный участок тяжелой цепи	Вариабельный участок тяжелой цепи	
BSMUC16/CD3-001	H1H8767P (SEQ ID NO: 18)	CD3-VH-G (SEQ ID NO: 1730)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-002	H1H8767P (SEQ ID NO: 18)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO: 1762)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-003	H1H8767P (SEQ ID NO: 18)	CD3-VH-G9 (SEQ ID NO: 1778)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-004	H1H8767P (SEQ ID NO: 18)	CD3-VH-G10 (SEQ ID NO: 1786)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-005	H1H8767P (SEQ ID NO: 18)	CD3-VH-G20 (SEQ ID NO: 1866)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)

Легкие цепи, перечисленные в табл. 4, были общими как для CD3, так и MUC16 плечей нацеливания биспецифичных антител. В табл. 1 и 2 приведены идентификаторы последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот, соответственно, для различных вариабельных участков тяжелой цепи и их соответствующих CDR, плечей анти-MUC16 биспецифичных антител этого примера. В табл. 23 и 23 приведены идентификаторы последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот, соответственно, для различных вариабельных участков тяжелой цепи и их соответствующих CDR, плечей анти-CD3 биспецифичных антител этого примера.

Пример 4. Аффинность связывания и кинетические константы поверхностного плазмонного резонансного происхождения на основе человеческих моноклональных анти-MUC16 моноспецифичных и анти-MUC16хCD3 биспецифичных антител.

Аффинности связывания и кинетические константы человеческих анти-MUC16 антител были определены с помощью поверхностного плазмонного резонанса реального времени (SPR; Biacore 4000 или Biacore T-200, GE Healthcare Life Sciences, Питтсбург, Пенсильвания) при 25°C. Анти-MUC16 антитела, протестированные в этом примере, представляли собой двухвалентные моноспецифичные связывающие вещества с MUC16 (экспрессируемые с константным участком hIgG1 (H1H), mIgG1 (H1M), mIgG2 (H2M) или mIgG3 (H3M)) или биспецифичные антитела, состоящие из анти-MUC16 связывающего домена и анти-CD связывающего домена. Антитела захватывали на поверхности сенсора CM4 или CM5 Biacore (GE Healthcare Life Sciences), дериватизированного путем аминного связывания с моноклональным антителом против человеческого Fc (GE, # BR-1008-39) или моноклональным антителом против мышинового Fc (GE, № BR-1008-38). Различные концентрации растворимого мономерного человеческого MUC16 в усеченном формате, охватывающем последние пять доменов SEA Муцина-16 (hMUC16.mmh или MUC16 "pub", SEQ ID: 1902), инъектировали поверх анти-MUC16 антитело захватывающей поверхности при скорости потока 50 мкл/мин (Biacore T-200) или 30 мкл/мин (Biacore 4000). Ассоциация антитело-реагент контролировалась в течение 4 минут, а диссоциация - в течение 6-10 минут. Все исследования связывания проводили в буфере HBS-ET (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% об./об. ПАВ P20).

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подгонки сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для подгонки кривых Scrubber 2.0с. Константы равновесия диссоциации связывания (KD) и диссоциативные периоды полураспада ( $t^{1/2}$ ) рассчитывались по кинетическим константам скорости как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t^{1/2} (мин) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Кинетические параметры связывания для моноспецифичных анти-MUC16 антител с мономерным фрагментом белка MUC16 человека, показаны ниже в табл. 5А и 5В. Кинетические параметры связывания анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичных антител с мономерным человеческим белком MUC16 показаны ниже в табл. 6.

Таблица 5А

Аффинность связывания Вiasore гибридомы анти-MUC16 антител (Н1М, Н2М и Н3М) с hMUC16 фрагментом при 25°C

Идентификатор антитела	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K <sub>D</sub> (М)	t 1/2 (мин)
H2M7128N	1.89E+05	6.40E-04	3.39E-09	18
H1M7129N	5.31E+04	1.04E-04	1.97E-09	111
H2M7131N	6.47E+04	1.62E-04	2.51E-09	71
H3M7132N	2.57E+04	1.96E-04	7.62E-09	59
H2M7133N	1.67E+05	3.77E-04	2.26E-09	31
H2M7134N	6.55E+04	1.62E-04	2.47E-09	71
H2M7135N	5.10E+04	2.18E-04	4.27E-09	53
H1M7137N	5.30E+04	9.09E-05	1.72E-09	127
H2M7138N	7.41E+04	9.25E-05	1.25E-09	125
H1M9519N	OC	OC	OC	OC
H1M9521N	OC	OC	OC	OC
H3M9524N	OC	OC	OC	OC
H3M9525N	OC	OC	OC	OC
H1M9528N	OC	OC	OC	OC
H3M9529N	OC	OC	OC	OC

OC: отсутствует связывание.

Таблица 5В

Аффинность связывания Вiasore Fc человека анти-MUC16 антител (Н1Н) с hMUC16 фрагментом при 25°C

Идентификатор антитела	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K <sub>D</sub> (М)	t <sub>1/2</sub> (мин)
H1H8755P	5.22E+05	1.49E-04	2.86E-10	77
H1H8767P	1.17E+05	4.18E-04	3.58E-09	28
H1H8770P	2.47E+05	3.08E-04	1.25E-09	38
H1H8783P	1.74E+05	1.07E-04	6.14E-10	108
H1H8790P	1.01E+05	7.61E-04	7.53E-09	15
H1H8794P	3.62E+05	2.79E-04	7.71E-10	41
H1H8799P	7.90E+04	3.66E-04	4.63E-09	32
H1H8799P2	7.58E+04	3.73E-04	4.92E-09	31
H1H8804P	4.94E+04	6.07E-04	1.23E-08	19
H1H8808P	4.12E+03	2.16E-04	5.24E-08	54
H1H8810P	5.77E+04	3.16E-04	5.48E-09	37
H1H8813P	5.32E+04	2.32E-04	4.35E-09	50

Таблица 6

Аффинность связывания Biacore анти-MUC16/анти-CD3  
биспецифичных антител с hMUC16 фрагмента при 25°C

Идентификатор биспецифичного антитела	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$ (мин)
BSMUC16/CD3-001	9.48E+04	5.86E-04	6,18E-09	20
BSMUC16/CD3-005	9.41E+04	5.64E-04	6.00E-09	21

Как показывают результаты, большинство анти-MUC16 антител по данному изобретению связаны с растворимым человеческим белком MUC16, некоторые отображают суб-наномолярную аффинность. Несколько антител (H1M9519N, H1M9521N, H3M9524N, H3M9525N, H1M9528N, H3M9529N) не показали связывания с усеченным форматом, охватывающим последние пять доменов SEA, посредством поверхностного плазмонного резонанса, однако продемонстрировали специфическое связывание с эндогенным человеческим MUC16, экспрессируемым на клетках OVCAR-3 в основанном на клетках анализе связывания. Анти-MUC16хCD3 биспецифичные антитела по данному изобретению также связывались с растворимым усеченным человеческим белком MUC16, проявляющим наномолярную аффинность в этом анализе.

Пример 5. Дополнительные свойства связывания, активации Т-клеток и цитотоксичности иллюстративных биспецифичных антител.

В этом примере способность MUC16хCD3 биспецифичных антител связываться с CD3-экспрессирующими (Т-клетки человека) клеточными линиями человека, по сравнению со связыванием с мишень-специфической (MUC16-специфической) клеточной линией, была определена посредством FACS. Кроме того, способность этих биспецифичных антител активировать мишень-специфические линии клеток (MUC16-специфические), также сравнивали в аналогичном анализе.

Титрование связывания иллюстративных биспецифичных антител, измеренное с помощью анализа FACS А. Вкратце, анализ проточной цитометрии (т.е. активированной флуоресценцией сортировкой клеток, или FACS) использовали для определения связывания биспецифичных антител с клетками Jurkat или клетками, экспрессирующими MUC16 человека, с последующим обнаружением с помощью меченого фикоэритрина (PE) или меченого APC антитела против человеческого IgG. Вкратце,  $2 \times 10^5$  клеток/лунка инкубировали в течение 30 минут при 4°C с серийным разведением в диапазоне от 1,33E-07M до 8,03E-12M каждого тестируемого антитела или изотипического контроля (антитела того же изотипа, который связывает другой антиген с отсутствующей перекрестной реактивностью к MUC16 или CD3). После инкубации клетки дважды промывали холодным PBS, содержащим 1% фильтрованный FBS, и к клеткам добавляли PE-конъюгированное или APC-конъюгированное вторичное анти-человеческое антитело и инкубировали в течение дополнительных 30 минут. Лунки, не содержащие антител или только вторичные, также использовали в качестве контролей. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в 200 мкл холодного PBS, содержащего 1% фильтрованный FBS, и анализировали проточной цитометрией на BD FACS Canto II; см. табл. 7А.

В. В отдельных экспериментах с условиями аналогичными описанным выше, анализ методом проточной цитометрии (или FACS) использовали для определения связывания выбранных биспецифичных антител с клетками Jurkat, PEO-1, OVCAR3-Luc и Т-клетками яванского макака. Для анализа титрования - серийное разведение выбранных биспецифичных антител MUC16хCD3, первого антитела изотипического контроля (человеческое химерное антитело IgG4, которое связывает нерелевантный человеческий антиген без перекрестной реактивности с CD3 человека или яванского макака) и второго антитела изотипического контроля (человеческое химерное антитело IgG4, которое связывает нерелевантный человеческий антиген без перекрестной реактивности с человеческим MUC16), в диапазоне от 66, 6 нМ до 0,001 нМ; см. табл. 7В и фиг. 11А-11С.

Для FACS анализа, клетки были стробированы по высоте переднего рассеяния по сравнению с областью прямого разброса для выбора отдельных событий, а затем в стороны и прямым разбросом. EC50 для титрования связывания клеток определяли с использованием программного обеспечения PRISM™ (GraphPad Software, Inc., Ла-Холья, Калифорния). Значения были рассчитаны с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа. (Liu, J., et al. 2005, Biotechnol Letters 27: 1821-1827). Значение EC50 представляет концентрацию тестируемого антитела, при которой наблюдается 50% его максимального связывания.

Таблица 7А

Связывание FACS на CD3 и MUC16-специфичных клеточных линиях

Идентификатор биспецифичного антитела	Анти-CD3 связывающее плечо	Титрование связывания FACS EC <sub>50</sub> [M]	
		Jurkat	OVCAR3 (MUC16+)
[01]	[01]	Jurkat	OVCAR3 (MUC16+)
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.21E-09	1.20E-09
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	Очень слабо	2.69E-09

Таблица 7В

Связывание FACS на CD3 и MUC16-специфических клеточных линиях

Идентификатор биспецифичного антитела	Анти-CD3 связывающее плечо	Титрование связывания FACS EC <sub>50</sub> [M]			
		PEO-1 (MUC16+)	OVCAR3-Luc (MUC16+)	Jurkat	Т-клетки яванского макака
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.02E-09	1.32E-09	6.44E-09	1.56E-08
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.13E-09	Не тестировано	3.01E-07	Без связывания
BSMUC16/CD3-005	CD3-VH-G20	2.63E-09	1.47E-09	6.26E-08	1.17E-06

Как показано в табл. 7А и 7В, CD3 связывающие плечи каждого MUC16 биспецифичного антитела отображают диапазон связывания клеток с CD3-экспрессирующими Т-клетками человека и обезьяны (например, от 3,2 нМ EC<sub>50</sub> до очень слабого связывания). Биспецифичное антитело BSMUC16/CD3-001 показало высокое измерение связывания с CD3-экспрессирующими клетками (т.е. <7 нМ), тогда как биспецифичное антитело BSMUC16/CD3-002 показало слабое связывание или отсутствие связывания с CD3-экспрессирующими клетками человека и обезьяны. Неизмеримое связывание или отсутствие измеримого связывания в анализе FACS или эквивалентном анализе относится к взаимодействию связывания между антителом и его антигеном-мишенью, которое находится за пределами предела обнаружения анализа (например, при или выше 1 мкМ). Тестируемые биспецифичные антитела демонстрировали сходное связывание клеток на линиях клеток, экспрессирующих MUC16, подтверждая, что биспецифичное спаривание с отдельными плечами CD3, демонстрирующее высокие или слабые (или не поддающиеся измерению) взаимодействия с CD3, не влияло или не уменьшало специфичное для мишени связывание (MUC16-специфичное связывание было меньше или равно 3 нМ (высокая степень связывания) в этих примерах. Первое контрольное антитело не связывалось с клетками CD3<sup>+</sup>, а второе контрольное антитело не связывалось с клетками MUC16<sup>+</sup>; см. также фиг. 11А-11С.

Антитела, проявляющие слабое или отсутствие детектируемого связывания с CD3 человека, по-прежнему считаются полезными для биспецифичного спаривания, обусловленного авидностью, и дополнительно тестировались на цитотоксичность *in vitro* (см. ниже) и *in vivo* (пример 8).

Активация Т-клеток и опухолеспецифическая цитотоксичность, проявляемая биспецифичными антителами при измерении *in vitro* А. Специфичное уничтожение MUC16-экспрессирующих клеток-мишеней опухоли в присутствии CD3 на основе биспецифичных антител контролировали с помощью проточной цитометрии. Как сообщалось ранее, биспецифичные антитела проявляли способность к дифференциальному связыванию с белком CD3 и клеточными линиями, экспрессирующими CD3 (т.е. очень слабое или сильное связывание). Эти те же биспецифичные антитела были протестированы на способность индуцировать наивные человеческие Т-клетки для перенаправления уничтожения на клетки, экспрессирующие мишень.

Вкратце, MUC16-экспрессирующие (OVCAR3) клеточные линии были мечены с 1 мкМ флуоресцентного красителя отслеживания Violet Cell Tracker. После мечения клетки высевали в течение ночи при 37°C. Отдельно РВМС человека высевали в среду RPMI с добавлением 1×10<sup>6</sup> клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитов путем истощения прилипших макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с прикрепленными клеточно-истощенными нестимулированными РВМС (соотношение эффектор/клетка-мишень 4:1) и серийным разведением соответствующих биспецифичных антител или изоти-

пического контроля (диапазон концентраций: от 66,7 нМ до 0,25 пМ) в течение 4 8 часов при 37°C. Клетки извлекали из планшетов для культивирования клеток с использованием буфера для диссоциации клеток без ферментов и анализировали с помощью FACS. Смотрите результаты, представленные в табл. 8А.

В. В аналогичных исследованиях, MUC16-экспрессирующие (PEO-1 или OVCAR3-Luc) клеточные линии были мечены, их высевали и инкубировали в течение ночи, как описано. Последовательные разведения биспецифичных антител MUC16хCD3 или изотипического контроля были совместно инкубированы; см. результаты, изображенные в табл. 8В и 8С и на фиг. 12А-12В.

Для FACS анализа, клетки окрашивали мертвыми/живыми дальним красным трекером клетки (Invitrogen).  $5 \times 10^5$  гранул для подсчета добавляли в каждую лунку непосредственно перед анализом FACS.  $1 \times 10^4$  гранул были собраны для каждого образца. Для оценки специфичности уничтожения клетки были стробированы на живых популяциях, помеченных фиолетовым. Процент живой популяции был записан и использован для расчета нормированной выживаемости.

Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD69 и/или CD25, и сообщая процент ранних активированных (CD69+) Т-клеток и/или в конце активированных (CD25+) Т-клеток из общего количества Т-клеток (CD2+).

Как показывают результаты в табл. 8А-8С, истощение MUC16-экспрессирующих клеток наблюдалось с биспецифичными анти-MUC16хCD3. Все протестированные биспецифичные антитела активировали и направляли человеческие Т-клетки на истощение клеток-мишеней с  $EC_{50}$  в пиколярном диапазоне. Кроме того, наблюдаемый лизис клеток-мишеней (истощение) был связан с повышающей регуляцией CD69 (или CD25) на CD2+ Т-клетках, также с пиколярным (пМ)  $EC_{50}$ .

Важно отметить, что результаты этого примера также показывают, что биспецифичное антитело, сконструированное со связывающим плечом CD3, которые проявляли слабое или не измеримое связывания с белком CD3 или CD3-экспрессирующими клетками (т.е. CD3-VH-G5), все еще сохраняли способность активировать Т-клетки и проявляли сильную цитотоксичность опухолевых антиген-экспрессирующих клеток.

Таблица 8А

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток  
выбранных MUC16хCD3 биспецифичных антител

Идентификатор биспецифичного антитела	Анти-CD3 связывающее плечо	OVCAR3 истощение клеток $EC_{50}$ [М]	Активация Т-клеток (положительная регуляция CD69) $EC_{50}$ [М]
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	2.24E-11	5.88E-12
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.06E-11	1.01E-11

Таблица 8В

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток  
выбранных MUC16хCD3 биспецифичных антител

Идентификатор биспецифичного антитела	PEO-1 истощение клеток $EC_{50}$ [М]	Активация Т-клеток (Положительная регуляция CD69) $EC_{50}$ [М]	Активация Т-клеток (Положительная регуляция CD25) $EC_{50}$ [М]
BSMUC16/CD3-001	2.56E-11	8.34E-12	3.90E-11
BSMUC16/CD3-002	6.75E-11	1.34E-11	8.89E-11
BSMUC16/CD3-005	7.74E-11	1.72E-11	1.06E-10

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток выбранных MUC16хCD3 биспецифичных антител

Идентификатор биспецифичного антитела	OVCA3-Лис истощение клеток EC <sub>50</sub> [М]	Активация Т-клеток (положительная регуляция CD69) EC <sub>50</sub> [М]	Активация Т-клеток (положительная регуляция CD25) EC <sub>50</sub> [М]
BSMUC16/CD3-001	1.54E-11	2.98E-12	3.06E-11
BSMUC16/CD3-005	5.16E-11	1.54E-11	1.17E-10

Пример 6. Эпитопное картирование на основе водородного/дейтериевого (H/D) обмена анти-Muc16 антител H4sH8767P, H1H8794P2 и H1H8799P2, связывающихся с частью С-концевого домена hMUC16.

Эксперименты проводились с целью определения остатков аминокислоты MUC16 в пределах пяти С-концевых SEA доменов (SEQ ID NO: 1902, далее именуемая как hMUC16.nub), с которыми анти-MUC16 антитела H4sH8767P, H1H8794P2 и H1H8799P2 взаимодействуют. Для этой цели использовали картирование эпитопа водород/дейтерий (H/D) с масс-спектрометрией (HDX-MS). Общее описание способа обмена H/D изложено в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Эксперименты HDX-MS были выполнены на единой платформе Waters HDX/MS, состоящей из системы PAL Leaptec HDX для маркировки дейтерия, Waters Acquity М-класса (вспомогательный менеджер растворителя) для переваривания и загрузки образца, Waters Acquity М-класса (μBinary менеджер растворителя) для градиента аналитической колонки и масс-спектрометр Synapt G2-Si для измерения пептической массы пептида.

Маркировочный раствор готовили в 10 мМ буфера PBS в D<sub>2</sub>O при рD 7,0. Для мечения дейтерием, инкубировали 3,8 мкл hMUC16.nub (12 пмоль/мкл) или hMUC16.nub, предварительно смешанных с анти-MUC16 антителом H4sH8767P, H1H8794P2 или H1H8799P2 в молярном соотношении 2:1, с 56,2 мкл. Раствор D<sub>2</sub>O для маркировки в различные моменты времени (например: недеитерированный контроль=0 с; маркировка дейтерием: 1 мин и 20 мин). Дейтерирование гасили путем переноса 50 мкл образца в 50 мкл предварительно охлажденного буфера гашения (0,2 М ТСЕР, 6 М гуанидинхлорида в 100 мМ фосфатного буфера, рН 2,5) и смешанный образец инкубировали при 1,0°C в течение двух минут. Затем погашенный образец вводили в Waters HDX Manager для онлайн-расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды были захвачены на ACQUITY UPLC VEN C18 1,7 мкм, предварительной колонке VanGuard 2,1×5 мм при 0°C и элюированы в аналитическую колонку ACQUITY UPLC VEN C18 (1,7 мкм, 1,0×50 мм) для 9 минутного градиентного разделения 5%-40% В (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Масс-спектрометр использовал напряжение в конусе 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон масса/заряд 50-1700 Тн.

Для идентификации пептидных остатков hMUC16.nub, с которыми H4sH8767P, H1H8794P2 и H1H8799P2 взаимодействуют, LC-MS<sup>E</sup> данные из недеитерированного образца были обработаны и был проведен поиск по базе данных, которая включает последовательности для hMUC16.nub, пепсина и рандомизированной последовательности с использованием программного обеспечения Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды были импортированы в программное обеспечение DynamX и отфильтрованы по двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту: 0,25 и 2) порог файла репликации: 2. Программное обеспечение DynamX затем автоматически определяло поглощение дейтерия каждым пептидом на основе времени удерживания и высокой точности массы (<10 миллионов долей) в нескольких временных точках с 3 повторностями в каждый раз.

При использовании онлайн пепсин/протеазы XIII колонки в сочетании с получением данных MS<sup>E</sup>, в общей сложности 109 пептидов из hMUC16.nub были идентифицированы в отсутствие или в присутствии H4sH8767P, что составляет 64% покрытия последовательности. Шесть пептидов значительно снизили поглощение дейтерирования (значения дельты центроида >0,5 дальтон по меньшей мере из одной временной точки с р-значениями < 0,05) при связывании с H4sH8767P и проиллюстрированы в табл. 9А. Записанная масса пептида соответствует среднему значению массы MH<sup>+</sup> центроида из трех повторностей. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 428-434, 453-467 и 474-481 hMuc16.nub, имели более низкие скорости дейтерирования при связывании с H4sH87 67P. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 14237-14243, 14262-14276 и 14283-14290 hMUC16, как определено в записи Uniprot Q8WXI7 (MUC16\_HUMAN), SEQ ID NO: 1899.

Таблица 9А

Пептиды hMUC16.nub с измененными скоростями дейтерирования при связывании H4sH8767P

Остатки SEQ ID NO: 1902	Аминокислотная последовательность	1 мин. дейтерирования			20 мин. дейтерирования		
		hMUC16.nub	hMUC16.nub +H4sH8767P	$\Delta$	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H4sH8767P	$\Delta$
428-434	LYKGSQL	809,97 ± 0,03	809,07 ± 0,06	<b>-0,26</b>	811,05 ± 0,16	810,17 ± 0,01	<b>-0,88</b>
429-434	YKGSQL	697,10 ± 0,00	696,74 ± 0,00	<b>-0,35</b>	698,13 ± 0,02	697,60 ± 0,03	<b>-0,52</b>
453-467	VTVKALFS SNLDPSL	1595,35 ± 0,08	1593,97 ± 0,2	<b>-1,38</b>	1596,01 ± 0,08	1595,33 ± 0,03	<b>-0,68</b>
459-467	FSSNLDPSL	983,19 ± 0,01	981,57 ± 0,08	<b>-1,62</b>	983,51 ± 0,03	982,76 ± 0,07	<b>-0,75</b>
460-467	SSNLDPSL	835,44 ± 0,01	834,01 ± 0,00	<b>-1,43</b>	835,89 ± 0,01	835,12 ± 0,15	<b>-0,74</b>
474-481	DKTLNASF	899,76 ± 0,00	899,25 ± 0,06	<b>-0,51</b>	900,63 ± 0,00	900,10 ± 0,03	<b>-0,54</b>

При использовании онлайн пепсин/протеаза XIII колонки в сочетании с получением данных MS<sup>E</sup>, в общей сложности 109 пептидов из hMUC16.nub были идентифицированы в отсутствие или в присутствии H1H8794P2, что составляет 64% покрытия последовательности. Три пептида значительно снизили поглощение дейтерирования (значения дельты центроида >0,5 Да по меньшей мере из одной временной точки с р-значениями <0,05) при связывании с H1H8794P2 и проиллюстрированы в табл. 9В. Записанная масса пептида соответствует среднему значению массы MH<sup>+</sup> центроида из трех повторностей. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 126-131, 127-131 и 132-138 hMuc16.nub, имели более низкие скорости дейтерирования при связывании с H1H8794P2. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 13935-13940, 13936-13940 и 13941-13947 hMUC16, как определено в записи Uniprot Q8WX17 (MUC16\_HUMAN), SEQ ID NO: 1899.

Таблица 9В

Пептиды hMUC16.nub с измененными скоростями дейтерирования при связывании H1H8794P2

Остатки SEQ ID NO: 1902	Аминокислотная последовательность	1 мин. дейтерирования			20 мин. дейтерирования		
		hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8794P2	$\Delta$	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8794P2	$\Delta$
126-131	LRYMAD	771,41 ± 0,01	770,60 ± 0,04	<b>-0,81</b>	771,91 ± 0,04	770,76 ± 0,02	<b>-1,15</b>
127-131	RYMAD	658,03 ± 0,02	657,32 ± 0,01	<b>-0,71</b>	657,89 ± 0,01	657,27 ± 0,01	<b>-0,6</b>
132-138	MGQPGSL	692,55 ± 0,02	691,42 ± 0,15	<b>-1,13</b>	692,61 ± 0,01	691,58 ± 0,02	<b>-1,03</b>

При использовании онлайн пепсин/протеаза XIII колонки в сочетании с получением данных MS<sup>E</sup>, в общей сложности 109 пептидов из hMUC16.nub были идентифицированы в отсутствие или в присутствии H1H8799P2, что составляет 64% покрытия последовательности. Четыре пептида значительно снизили поглощение дейтерирования (значения дельты центроида >0,5 Да по меньшей мере из одной временной точки с р-значениями <0,05) при связывании с H1H8799P2 и проиллюстрированы в табл. 9С. Записанная масса пептида соответствует среднему значению массы MH<sup>+</sup> центроида из трех повторностей. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 357-369, 358-366, 358-369 и 361-369 hMuc16.nub, имели более низкие скорости дейтерирования при связывании с H1H8799P2. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 14165-14178, 14166-14176, 14166-14178 и 14170-14178 hMUC16, как оп-

ределено в записи Uniprot Q8WXI7 (MUC16\_HUMAN), SEQ ID NO: 1899.

Таблица 9С

Пептиды hMUC16.nub с измененными скоростями дейтерирования при связывании H1H8799P2

Остатки SEQ ID NO: 1902	Аминокислотная последовательность	1 мин. дейтерирования			20 мин. дейтерирования		
		hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8799P2	$\Delta$	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8799P2	$\Delta$
357-369	LSQLTHGV	1404,15 ± 0,03	1403,41 ± 0,09	-0,74	1406,14 ± 0,15	1404,26 ± 0,02	-2,11
	TQLGF						
358-366	SQLTHGVT	972,37 ± 0,10	972,04 ± 0,10	-0,33	973,94 ± 0,03	972,56 ± 0,00	-1,38
	QL						
358-369	SQLTHGVT	1291,23 ± 0,02	1290,20 ± 0,00	-1,03	1291,34 ± 0,02	1291,05 ± 0,06	-2,27
	QLGF						
361-369	THGVTQLG	1404,15 ± 0,03	1403,42 ± 0,05	-0,73	1406,14 ± 0,14	1404,03 ± 0,02	-2,11
	F						

Пример 7. Фармакокинетическая оценка биспецифичных анти-MUC16×CD3 антител.

Оценка фармакокинетики анти-MUC16×CD3 биспецифичных антител BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 и изотипического контроля была проведена в гуманизированном MUC16×CD3 мышей (мышь, гомозиготные для экспрессии человеческого MUC16 и CD3, MUC16<sup>hu/hu</sup> × CD3<sup>hu/hu</sup>), гуманизированном CD3 мышей (мышь, гомозиготные для экспрессии человеческого CD3, CD3<sup>hu/hu</sup>) и мышей дикого типа, подобранных по линии (ДТ) (75% C57BL, 25% 129Sv). Когорты содержали 4-5 мышей на тестируемое антитело и на линию мыши. Все мыши получали одну внутрибрюшинную (в/б) дозу 0,4 мг/кг. Образцы крови собирали через 3 и 6 часов, 1, 3, 7, 14 и 28 дней после введения дозы. Кровь была обработана в сыворотку и заморожена при -80°C до анализа

Циркулирующие концентрации антител определяли с помощью общего анализа человеческого антитела IgG с использованием GyroLab Xplore™ (Gyros, Уппсала, Швеция). Вкратце, биотинилированное козье поликлональное анти-IgG антитело человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания) захватывалось на покрытые стрептавидином шарики на Gyrolab Bioaffy 200 CD (Gyros) для захвата человеческого IgG, присутствующего в сыворотке. После захвата аффинной колонкой связанное человеческое антитело IgG в образцах детектировали с помощью козьего анти-человеческого IgG, меченного Alexa-647 (Jackson ImmunoResearch). Флуоресцентный сигнал на колонке, позволяющий обнаружить связанный IgG, и единицы ответа (RU) считывались прибором. Концентрации образцов определяли путем интерполяции по стандартной кривой, которая была подобрана с использованием подбора кривой с 5 параметрами с использованием программного обеспечения Gyrolab Evaluator.

Параметры ФК определялись некомпартментным анализом (NCA) с использованием программного обеспечения Phoenix® WinNonlin® версии 6.3 (Certara, LP, Принстон, Нью-Джерси) и внесосудистой моделью дозирования. Используя соответствующие средние значения концентрации для каждого антитела, все параметры ФК, включая наблюдаемую максимальную концентрацию в сыворотке ( $C_{max}$ ), оцененный наблюдаемый период полураспада ( $t_{1/2}$ ) и площадь под кривой концентрации в зависимости от времени до последней измеряемой концентрации ( $AUC_{последний}$ ) были определены с использованием линейного правила трапеции с линейной интерполяцией и равномерным взвешиванием.

После внутрибрюшинного введения антител мышам ДТ, общая концентрация-временные профили IgG BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и изотипического контроля все были похожи, характеризовались первым кратким распределением лекарств, за которым следовала одна фаза выведения лекарств в течение оставшейся части исследования. Максимальные сывороточные концентрации ( $C_{max}$ ) и расчетное воздействие лекарственного средства ( $AUC_{последний}$ ) для трех антител были сопоставимы (в 1,3 раза друг от друга).

После внутрибрюшинного введения антител CD3<sup>hu/hu</sup> мышам, BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и изотипический контроль имели сопоставимые концентрации  $C_{max}$  (4,6, 3,6 и 4,1 мг/мл соответственно). BSMUC16/CD3-005 и изотипический контроль демонстрировали сходные кривые элиминации лекарственного средства, в то время как BSMUC16/CD3-001 демонстрировал более резкую элиминацию лекарственного средства, чем оба, предполагая, что связывание мишени CD3 человека вызывает клиренс. Концевая концентрация антител для BSMUC16/CD3-001 составила 0,03 мг/мл, что около в 28 раз меньше, чем концевые концентрации антител, определенные для изотипического контроля (0,85 мг/мл), и в 22 раза меньше, чем BSMUC16/CD3-005 (0,66 мг/мл) сывороточные концентрации.

У MUC16<sup>hu/hu</sup> × CD3<sup>hu/hu</sup> дважды гуманизированных мышей, биспецифичные Muc16xCD3 и антитела изотипического контроля имели сопоставимые концентрации  $C_{\max}$  ( $C_{\max}$  диапазон: 4,5-6,9 мкг/мл). Оба биспецифичных антитела продемонстрировали более высокую элиминацию лекарственного средства, чем изотипический контроль, что предполагает мишень-опосредованный эффект. Концевые концентрации антител для BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 были около в 29 раз и в 2,9 раз меньше, соответственно, чем концевые концентрации антител, определенные для изотипического контроля (0,86 мкг/мл).

Краткое изложение данных по общей концентрации анти-MUC16 × CD3 биспецифичных антител и антител изотипического контроля приведены в табл. 10. Средние параметры ФК описаны в табл. 11А и 11В. Средние общие концентрации антител в зависимости от времени показаны на фиг. 1, 2 и 3. В заключение следует отметить, что биспецифичные MUC16xCD3 антитела демонстрировали сходные кривые  $C_{\max}$  и элиминации лекарственного средства у мышей ДТ, но BSMUC16/CD3-001 демонстрировали более высокие показатели элиминации, чем BSMUC16/CD3-005 и изотипического контроля у CD3 единожды гуманизированных мышей и MUC16/CD3 дважды гуманизированных мышей. Поскольку биспецифичные антитела, вводимые в этом исследовании ФК, состоят из одного и того же анти-MUC16-связывающего плеча, результаты показывают, что сила связывания CD3-нацеливающего плеча может играть роль в уровнях воздействия лекарственных средств ( $AUC_{\text{-последний}}$ ) и скорости элиминации лекарственных средств. Ни BSMUC16/CD3-001, ни BSMUC16/CD3-005 не связывают MUC16 мыши или CD3 мыши.

Средние концентрации общего IgG в сыворотке после однократной внутрибрюшинной инъекции 0,4 мг/кг BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и антител изотипического контроля у мышей ДТ, гуманизированных мышей CD3 и гуманизированных мышей MUC16 × CD3

Антитело	Время (Д)	Общая концентрация МАТ в мышинной сыворотке					
		ДТ		CD3 <sup>hu/hu</sup>		MUC16 <sup>hu/hu</sup> × CD3 <sup>hu/hu</sup>	
		Среднее (мкг/мл)	+/- SD	Среднее (мкг/мл)	+/- SD	Среднее (мкг/мл)	+/- SD
BSMUC16/CD3-001	0,13	5,39	0,34	4,30	0,29	6,77	1,52
	0,25	5,80	0,36	4,26	1,07	6,63	1,06
	1,00	4,13	0,43	2,87	0,71	4,89	0,53
	3,00	3,19	0,53	1,44	0,27	2,50	0,22
	7,00	2,61	0,73	0,72	0,13	1,20	0,22
	14,00	1,44	0,69	0,18	0,05	0,28	0,08
	21,00	0,93	Не обнаружено	0,07	0,02	0,06	0,05
	28,00	0,60	Не обнаружено	0,04	0,01	0,03	0,02
BSMUC16/CD3-005	0,13	4,23	0,62	3,35	1,15	4,35	0,24
	0,25	4,53	0,55	3,40	0,96	4,45	0,49
	1,00	3,47	0,32	2,72	0,42	3,00	0,61
	3,00	2,51	0,13	1,95	0,37	1,98	0,41
	7,00	2,02	0,24	2,31	0,67	1,58	0,36
	14,00	1,19	0,17	1,01	0,23	0,78	0,26
	21,00	1,19	0,29	1,19	0,11	0,66	0,29
	28,00	0,71	0,20	0,66	0,28	0,30	0,22
Изотипический контроль	0,13	5,07	1,16	5,43	1,30	6,56	0,70
	0,25	5,91	1,10	5,67	1,91	6,48	0,90
	1,00	2,64	0,24	2,98	1,14	2,82	0,30
	3,00	2,05	0,06	2,29	0,83	1,57	0,37
	7,00	1,80	0,25	2,14	0,85	1,96	0,37
	14,00	1,22	0,28	1,48	0,66	1,34	0,37
	21,00	1,20	0,58	1,43	0,72	1,24	0,44
	28,00	0,73	0,24	0,85	0,29	0,86	0,41

Время: (ч, если отмечено)=время в часах после однократного введения; Д=день обучения; 30=стандартное отклонение; НО=не обнаружено из-за исключения мышей с клирингом лекарственных препаратов титрами анти-лекарственных препаратов.

Таблица 11А

Краткое содержание фармакокинетических параметров: CD3<sup>hu/hu</sup> гуманизированных мышей

Параметр	Единицы	Мыши ДТ			CD3 <sup>hu/hu</sup> мышей		
		Изотипический контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16 /CD3-005	Изотипический контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16/CD3-005
C <sub>max</sub>	мкг/мл	5 ± 3	6 ± 0,4	5 ± 0,5	4,1 ± 3	4,6 ± 0,8	3,5 ± 1
T <sub>1/2</sub>	д	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	14 ± 0,5	3,9 ± 0,6	11 ± 5
AUC <sub>Последний</sub>	д • мкг/мл	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	49 ± 20	16 ± 3	36 ± 13

C<sub>max</sub>=пиковая концентрация; AUC=площадь под кривой концентрация-время; AUC<sub>последний</sub>=AUC, вычисленное с момента нуля до времени последней положительной концентрации; T<sub>1/2</sub>=ожидаемый период полураспада.

Таблица 11В

Краткое содержание фармакокинетических параметров:

MUC16<sup>hu/hu</sup> × CD3<sup>hu/hu</sup> дважды гуманизированной мыши

Параметр	Единицы	Мыши ДТ			MUC16 <sup>hu/hu</sup> × CD3 <sup>hu/hu</sup> мышей		
		Изотипический контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16 /CD3-005	Изотипический контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16/CD3-005
C <sub>max</sub>	мкг/мл	5 ± 3	6 ± 0,4	5 ± 0,5	6,7 ± 0,7	6,9 ± 1	4,5 ± 4
T <sub>1/2</sub>	д	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	12,9 ± 4	3,3 ± 0,8	8,2 ± 4
AUC <sub>Последний</sub>	д □ мкг/мл	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	46 ± 10	27 ± 3	34 ± 11

C<sub>max</sub>=пиковая концентрация; AUC=площадь под кривой концентрация-время; AUC<sub>последний</sub>=AUC, вычисленное с момента нуля до времени последней положительной концентрации; T<sub>1/2</sub>=ожидаемый период полураспада.

Пример 8. Анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичные антитела проявляют сильную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для того чтобы определить эффективность *in vivo* иллюстративного анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичных антител, идентифицированных как имеющие слабое или отсутствующее детектируемое связывание для человека и яванского макака CD3, исследования были проведены у мыши с ослабленным иммунитетом, несущей ксенотрансплантаты рака простаты человека. Эффективность выбранных биспецифичных антител была протестирована как на моделях немедленного лечения, так и на моделях терапевтического дозированного лечения.

Эффективность анти-MUC16/анти-CD3 биспецифичных антител на моделях ксенотрансплантата опухоли человека.

Чтобы оценить *in vivo* эффективность биспецифичных анти-MUC16/анти-CD3 в исследованиях ксенотрансплантатов опухолей человека, NOD scid гамма (NSG) мышам (Jackson Laboratories, Бар Харбор, Мэн) предварительно имплантировали мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMCs; ReachBio LLC., Сиэтл, Вашингтон), а затем им дают асцитные клетки из линии клеток рака яичника человека OVCAR-3 (American Type Tissue Culture, Манассас, Виргиния), трансдуцированные люциферазой (OVCAR-3/Luc). Клетки OVCAR-3 эндогенно экспрессируют MUC-16.

Вкратце, NSG мышам вводили внутривенно (в/б) с  $5,0 \times 10^6$  PBMCs человека. 8 дней спустя  $1,5 \times 10^6$  асцитных клеток из клеточной линии OVCAR-3/Luc, ранее пассажированных *in vivo*, вводили внутривенно мышам NSG, которым имплантировали PBMC. В группе немедленного лечения мышей лечили внутривенно в день имплантации клеток OVCAR-3/Luc биспецифичными MUC16/CD3 антителами BSMUC16/CD3-001 или BSMUC16/CD3-005 или изотипическим контролем в дозе 10 мкг/мышь (N=5 мышей/группа лечения). В модели терапевтической дозы мышам вводили внутривенно. 7 дней после имплантации опухоли биспецифичными MUC16/CD3 или контрольными антителами, описанными выше, в дозе 10 мкг/мышь (N=5/группа лечения).

Во всех исследованиях, рост опухоли контролировали с помощью биоломинесцентной томографии (BLI). Мышам вводили внутривенно субстрат люциферазы D-люциферин, суспендированный в PBS (150 мг/кг), и визуализировали под анестезией изофлураном через 10 минут. BLI выполняли с использованием системы Xenogen IVIS (Perkin Elmer, Хопкинтон, Массачусетс), а сигналы BLI извлекали с использованием программного обеспечения Living Image (Xenogen/Perkin Elmer). Области интереса были нарисованы вокруг каждой клеточной массы, и интенсивности фотонов были записаны как фотоны(ф)/сек(с)/см<sup>2</sup>/стерадиан(ср). Для группы немедленного лечения данные представлены в виде уровней BLI через 26 дней после имплантации опухоли (табл. 12А). Для группы, получавшей терапевтическое

лечение, данные представлены как кратность изменения BLI между 6-м днем (1 день до лечения) и конечной точкой исследования (26-й день после имплантации опухоли; табл. 12B).

Как показывают результаты, как BSMUC16/CD3-001, так и BSMUC16/CD3-005 показали одинаковую эффективность в подавлении роста опухоли по сравнению с изотипическим контролем, когда BLI была измерена в день 26 в модели немедленного дозирования. Оба биспецифичных анти-MUC16/анти-CD3 антитела также подавляли рост установленных опухолей при введении через 7 дней после имплантации опухоли по сравнению с контролем. Таким образом, биспецифичные анти-MUC16/анти-CD3 антитела данного изобретения демонстрируют сильную противоопухолевую эффективность в нескольких моделях.

Таблица 12A

Эффективность биспецифичных анти-MUC16/анти-CD3 антител в модели ксенотрансплантата с ослабленным иммунитетом: немедленное дозирование

Модель опухоли/мышинная линия/Доза	Идентификатор биспецифичного антитела	N	Ср. биоллюминесцентное излучение (фотоны/сек/см <sup>2</sup> /стерадиан) 26 день (среднее значение ± SD)
OVCAR-3/Luc/ NSG/ 10 мкг/мышь	BSMUC16/CD3-001	5	$1,4 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^2$
[01]	BSMUC16/CD3-005	5	$1,5 \times 10^3 \pm 9,7 \times 10^2$
[01]	Изотипический контроль	5	$2,0 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^6$

Таблица 12B

Эффективность биспецифичных анти-Muc16/анти-CD3 антител в модели ксенотрансплантата с ослабленным иммунитетом: терапевтическое лечение

Модель опухоли/мышинная линия/Доза	Идентификатор биспецифичного антитела	N	Кратность изменения в Ср. биоллюминесцентное излучение (ф/сек/см <sup>2</sup> /ст) на 26 день относительно 6 дня (среднее значение ± SD)
OVCAR-3/Luc/ NSG/ 10 мкг/мышь	BSMUC16/CD3-001	5	$2,0 \pm 5,0$
[01]	BSMUC16/CD3-005	5	$0,01 \pm 0,02$
[01]	Изотипический контроль	5	$21,0 \pm 8,0$

В дальнейших экспериментах, эффективность *in vivo* биспецифичного анти-MUC16/анти-CD3 антитела была оценена в ксеногенных и сингенных моделях опухолей. Для первой ксеногенной модели, мышам NSG внутрибрюшинно (в/б) инъектировали клетки OVCAR-3/Luc, предварительно пассажированные *in vivo* (день 0), через одиннадцать дней после приживления человеческих РВМС. Мышам вводили внутрибрюшинно 0,01, 0,1 или 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-001 или вводили 0,5 мг/кг несвязывающего контроля или CD3-связывающего контроля в дни 6, 10, 13, 16 и 21. Опухолевую массу оценивали с помощью BLI на 6, 14 и 20 дни после имплантации опухоли. Лечение с помощью 0,1 или 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-001 приводило к значительной противоопухолевой эффективности, как определено измерениями BLI на 20-й день, как показано в табл. 13A-C и на фиг. 4-6. Для второй ксеногенной модели, мышам NSG инъектировали клетки OVCAR-3/Luc, предварительно пассажированные *in vivo* (день 0), через тринадцать дней после приживления человеческих РВМС, и в день 4 перенесли вторую группу РВМС. Мышей лечили внутривенно (в/в) с 0,1, 0,5, 1 или 5 мг/кг BSMUC16/CD3-005 или вводили 5 мг/кг несвязывающего контроля или CD3-связывающего контроля в дни 5, 8, 12, 15, 19 и 22. Опухолевую массу оценивали с помощью BLI на дни 4, 11, 18 и 25. Лечение 0,5, 1 или 5 мг/кг BSMUC16/CD3-005 приво-

дило к значительной противоопухолевой эффективности, как показано измерениями и кратностью изменения BLI (табл. 13D-F и фиг. 7-9). Чтобы исследовать эффективность в иммунокомпетентной модели, мышинный ген CD3 был заменен человеческим CD3, а часть мышинного гена MUC16 была заменена человеческой последовательностью. Замена привела к мышам, чьи Т-клетки экспрессируют человеческий CD3 и которая экспрессирует химерную молекулу MUC16, содержащую часть человеческого MUC16, где связывается биспецифичное BSMUC16/CD3-001 антитело. Для модели сингенной опухоли использовали клеточные линии ID8-VEGF, сконструированные для экспрессии части человеческого MUC16. Мышам имплантировали клетки ID8-VEGF/huMUC16 подкожно и обрабатывали 100 мкг BSMUC16/CD3-001 либо в день имплантации, либо через десять дней после имплантации, когда были обнаружены опухоли. Обработка со 100 мкг BSMUC16/CD3-001 привела к значительной противоопухолевой эффективности, как показано в табл. 13G и на фиг. 10.

Имплантация и измерение ксенотрансплантатов опухолей: асцитные клетки из OVCAR-3/Лус клеточной линии, ранее пассажированные *in vivo*, вводили внутрибрюшинно мышам NSG которым ранее имплантировали человеческие PBMC. BLI измеряли как показание роста опухоли через несколько дней после имплантации OVCAR-3/Лус и несколько раз во время исследования. После первоначального измерения BLI для когортирования, мышей разделили на группы по 4-6 животных в каждой и вводили биспецифичные MUC16хCD3 или контрольные антитела дважды в неделю в течение всего исследования.

Расчет роста и ингибирования опухоли.

ксенотрансплантата: Для измерения опухолевой массы использовали биолюминесцентную визуализацию. Мышам вводили внутрибрюшинно 150 мг/кг (как определено по массе тела в начале эксперимента) субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через десять минут после введения дозы выполняли визуализацию BLI у мышей под изофлурановым наркозом с использованием системы Xenogen IVIS. Получение изображения осуществляли с полем зрения в D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга в течение 0,5 мин времени экспозиции. BLI сигналы были получены с использованием программного обеспечения Living Image. Области интереса были нарисованы вокруг каждой опухолевой массы, и интенсивности фотонов были записаны как ф/с/см<sup>2</sup>/ср. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6). Статистическую значимость результатов BLI определяли с использованием непарного непараметрического t-критерия Манна-Уитни. Кратность изменения рассчитывали по формуле: (День 20-День 6)/День 6 для исследования 1 и (День 25-День 4)/День 4 для исследования 2.

Имплантация и измерение сингенных опухолей: мышам, экспрессирующим CD3 человека и человек-мышиную химеру MUC16 в соответствующих локусах мышей, имплантировали 10e6 ID8-VEGF/huMUC16 клеток подкожно (п/к). Мышам вводили BSMUC16/CD3-001 или CD3-связывающий контроль в/б, два раза в неделю в течение исследования. Лечение началось в день 0 или день 10 после имплантации. Рост опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю. Мышей умерщвляли через 47 дней после имплантации опухоли.

Расчет роста и ингибирования сингенной опухоли: Для определения объема опухоли с помощью внешнего штангенциркуля были определены наибольший продольный диаметр (длина) и наибольший поперечный диаметр (ширина). Объем опухоли на основе измерений штангенциркулем были рассчитаны по формуле: объем=(длина × ширина<sup>2</sup>)/2. Статистическую значимость определяли с использованием непарного непараметрического t-критерия Манна-Уитни.

Противоопухолевая эффективность биспецифичного BSMUC16/CD3-001 антитела в ксеногенной и сингенной *in vivo* моделях опухолей показана в табл. 13A-D, ниже.

Таблица 13A

Модельное исследование 1 OVCAR-3. Уровень биолюминесценции на 6 день после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Ср. излучение [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] 6 дней после имплантации (медиана ± SEM)
не связывающий контроль (0,5)	8,15e+05 ± 7,88 e+04
CD3-связывающий контроль (0,5)	6,39e+05 ± 8,67e+04
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	7,64e+05 ± 1,19 e+05
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	6,31e+05 ± 1,10 e+05
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	8,77e+05 ± 7,91 e+04

Таблица 13B

Модельное исследование 1 OVCAR-3. Уровень биоломинесценции на 20 день после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Ср. излучение [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] 20 дней после имплантации (медиана ± SEM)
не связывающий контроль (0,5)	8,63e+06 ± 1,45 e+06
CD3-связывающий контроль (0,5)	9,94e+06 ± 1,08e+06
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	9,37e+02 ± 9,62 e+02
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	2,36e+04 ± 1,28 e+06
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	6,51e+06 ± 1,60 e+06

Таблица 13C

Модельное исследование 1 OVCAR-3. Кратность изменения в BLI между 6 и 20 днями после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Кратность изменения в ср. излучении [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] с 6 дня до 20 дней после имплантации (среднее ± SD)
не связывающий контроль (0,5)	9,5 ± 1,9
CD3-связывающий контроль (0,5)	15,6 ± 6,7
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	-1,00 ± 0,00
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	1,2 ± 4,7
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	5,6 ± 4,2

Таблица 13D

Модельное исследование 2 OVCAR-3. Уровень биоломинесценции на 4 день после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Ср. излучение [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] 4 дней после имплантации (медиана ± SEM)
не связывающий контроль (5)	1,54e+05 ± 9,93e+03
CD3-связывающий контроль (5)	1,34e+05 ± 1,55e+04
BSMUC16/CD3-005 (5)	1,54e+05 ± 1,03e+04
BSMUC16/CD3-005 (1)	1,38e+05 ± 4,65e+03
BSMUC16/CD3-005 (0,5)	1,31e+05 ± 4,03e+03
BSMUC16/CD3-005 (0,1)	1,53e+05 ± 1,93e+04

Таблица 13E

Модельное исследование 2 OVCAR-3. Уровень биоломинесценции на 25 день после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Ср. излучение [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] 25 дней после имплантации (медиана ± SEM)
не связывающий контроль (5)	7,20e+06 ± 8,91e+05
CD3-связывающий контроль (5)	6,15e+06 ± 7,26e+05
BSMUC16/CD3-005 (5)	1,52e+03 ± 4,86e+05
BSMUC16/CD3-005 (1)	6,99e+03 ± 6,23e+03
BSMUC16/CD3-005 (0,5)	2,23e+03 ± 2,35e+05
BSMUC16/CD3-005 (0,1)	7,63e+06 ± 1,83e+06

Таблица 13F

Модельное исследование 2 OVCAR-3. Кратность изменения в BLI между 4 и 25 днями после имплантации опухоли

Антитело (мг/кг)	Кратность изменения в ср. излучении [ф/сек/см <sup>2</sup> /ст] с 4 дня до 25 дней после имплантации (среднее ± SD)
не связывающий контроль (5)	46,8 ± 20,6
CD3-связывающий контроль (5)	55,0 ± 14,7
BSMUC16/CD3-005 (5)	2,5 ± 8,5
BSMUC16/CD3-005 (1)	-0,9 ± 0,1
BSMUC16/CD3-005 (0,5)	0,7 ± 3,6
BSMUC16/CD3-005 (0,1)	45,4 ± 35,7

Таблица 13G

Модель ID8-VEGF/huMUC16. Размер опухоли (мм<sup>3</sup>) на 47 день

Начало лечения	Антитело (мкг)	Размер опухоли (мм <sup>3</sup> ) в день 47 (среднее значение ± SEM)
День 0	CD3-связывающий контроль (100)	827,5 ± 223,5
День 0	BSMUC16/CD3-001 (100)	51,2 ± 51,2
День 10	BSMUC16/CD3-001 (100)	273,8 ± 92,36

Пример 9. Получение и характеристика конъюгата.

Все моноклональные антитела были экспрессированы в клетках CHO и очищены белком А. Изотипический контроль также был приготовлен аналогичным образом. Не связывающее антитело изотипического контроля получали из иммунологического антигена, не имеющего отношения к онкологии.

Антитело (10 мг/мл) в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 обрабатывали 1 mM дитиотреитолом при 37°C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 4,5 ацетат натрия) к производному ДМСО (10 мг/мл) добавляли один из малеимида линкерных производных полезной нагрузки Соединения 7 или Соединения 10 (см. табл. 14) (1,2 эквивалента/SН группы) в ДМСО (10 мг/мл) для снижения содержания антител, и смесь доводят до pH 7,0 с помощью 1 M HEPES (pH 7,4). Соединение 7 и соединение 10, а также способы получения соединений описаны в публикации PCT № WO2014/145090, опубликованной 18 сентября 2014 г., и публикации PCT № WO2016/160615, опубликованной 6 октября 2016 г., соответственно, каждый из которых полностью включен в настоящую описание в качестве ссылки. Через 1 ч реакцию гасили избытком N-этилмалеимида. Конъюгаты очищали методом эксклюзионной хроматографии

размеров и стерильно фильтровали. Концентрации белка и линкера определяли с помощью УФ-спектрального анализа. Эксклюзионная ВЭЖХ установила, что все используемые конъюгаты были >95% мономерными. Выходы приведены в табл. 14 на основе определения белка. Все конъюгированные анти-тела анализировали УФ-излучением на значения нагрузки полезной нагрузки линкера согласно Hamblett et al., Cancer Res 2004 10 7063. Результаты суммированы в табл. 14.

Конъюгат, содержащий соединение 60 может быть получен с использованием аналогичного способа. Соединение 60 и способы получения соединения описаны в публикации РСТ № WO2016/160615 (пример 20), опубликованной 6 октября 2016 г., которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки. Соединение 60 представляет собой майтансин-N-метил-L-аланин-(3-метокси-4-амино)бензамидо-Cit-Val-Cap-Mal.

Таблица 14

Краткая информация о параметрах полезной нагрузки (хемотоксическое лекарственное средство) и антитело-лекарственное средство-конъюгат

Соединение	$\varepsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$	$\varepsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$
<b>7</b> [Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-метил-N-[4-(амино-цитруллин-валин-гексанамид-6-малеимидил) бензил] карбамата]	50600	8100
<b>10</b> [Майтансин-N-метил-L-аланин-4-аминобензамид-цитруллин-валин-капролил-6-малеимидил]	45990	20600
Антитело	$\varepsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$	$\varepsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$
H1N9519N	83995	235280
H1N9521N	85564	232050
Изотипический контроль	75113	218360
Конъюгат антитела	Полезная нагрузка: антитело (УФ)	Продуктивность %
H1N9519N-7	3,5	40
H1N9521N-7	3,6	40
H1N9521N-10	3,0	40
Изотипический контроль-7	3,0	60
Изотипический контроль-10	3,4	60

Пример 10. Конъюгаты лекарственного средства с анти-MUC16 антителом являются мощными ингибиторами роста опухоли на моделях ксенотрансплантата рака простаты *in vivo*, положительных по MUC16.

Для того чтобы определить эффективность *in vivo* анти-MUC16 антител, конъюгированных с соединением 7 и соединением 10, были проведены исследования мышей с ослабленным иммунитетом, несущих MUC16 положительные ксенотрансплантаты рака яичников.

Для этих исследований, самкам SCID мышей (Taconic, Хадсон, Нью-Йорк) были имплантированы OVCAR3 [NIN:OVCAR3 (OVCAR3, ATCC HTB-161)] клетки, трансфицированные люциферазой (OVCAR3/luc), которые эндогенно экспрессируют MUC16. Для внутрибрюшинных (в/б) опухолей, мышей рандомизировали на группы лечения и им вводили либо анти-MUC16 антитела, конъюгированные с лекарственным препаратом (см. пример 9), не связывающееся конъюгированное антитело, либо носитель после обнаружения люминесцентного сигнала опухоли. Для подкожных (п/к) ксенотрансплантатов, после того как опухоли достигли среднего объема 200 мм<sup>3</sup> (~ 16 день), мышей рандомизировали в группы лечения, и им вводили либо анти-MUC16 антитела, конъюгированные с лекарственным препаратом, не связывающееся конъюгированное антитело, либо носитель. В этих исследованиях *in vivo* антитела вво-

дили, а опухоли затем отслеживали до развития асцита или достижения среднего размера опухоли приблизительно 1200 мм<sup>3</sup> в группе, получавшей только носитель. В этот момент было рассчитано ингибирование роста опухоли.

В начальном внутрибрюшинном исследовании (в/б), в качестве примера анти-MUC16 антитела, конъюгированные с соединением 7 были исследованы на эффективность в снижении OVCAR3/luc сигнала люминесценции. Мыши получали четыре дозы анти-MUC16 и контрольных ADC один раз в неделю в дозе 85 мкг/кг лекарственного эквивалента на основе соотношения ADC лекарственное средство:антитело. Как показано в табл. 15А, Н1Н9519N-соединение 7 и Н1Н9521N-соединение-7 сильно ингибируют асцитный рост опухоли. Эти анти-MUC16 ADC эффективно уменьшали размер опухоли с уменьшением свечения опухоли на 100% по сравнению с контролем носителя. Контрольный ADC не опосредовал какого-либо ингибирования с помощью OVCAR/luc роста асцитных опухолевых клеток.

Дальнейшее исследование оценки эффективности анти-MUC16 ADC против подкожной (п/к) OVCAR3/luc опухоли суммировано в табл. 15В. Мыши получали четыре дозы анти-MUC16 и контрольных ADC один раз в неделю в дозе 85 мкг/кг лекарственного эквивалента на основе соотношения ADC лекарственное средство:антитело. При конъюгировании с соединением 7, MUC16 ADC Н1Н9519N-Соединение 7 и Н1Н9521N-Соединение 7 снова оказывали значительное противоопухолевое действие; на этот раз против подкожных OVCAR3/luc опухолей. Соответственно, эти ADC опосредовали 100% и 109% ингибирование роста опухоли соответственно. Контрольный ADC не опосредовал какого-либо ингибирования роста подкожной опухоли OVCAR/luc.

В третьем исследовании, эффективность Н1Н9521N анти-MUC16 антитела, конъюгированного с линкером лекарственного средства соединения 10, оценивали во в/б модели OVCAR3/luc опухоли. Мыши получали однократные дозы анти-MUC16 и контрольные ADC в дозе 85 мкг/кг, 170 мкг/кг и 340 мкг/кг в эквиваленте лекарственного средства в зависимости от соотношения лекарственное средство ADC:антитело. Как показано в табл. 15С, Н1Н9519N-10 сильно ингибирует асцитный рост опухоли. Дозы Н1Н9519N-соединение 10 привели к 99-100% ингибированию свечения опухоли относительно контроля носителя. Некоторое ингибирование наблюдалось для контрольного ADC с использованием соединения 10, хотя оно было более умеренным, чем то, которое наблюдалось после анти-MUC16 Н1Н9519N-соединение 10.

Таблица 15А

Ингибирование в/б роста опухоли OVCAR3/luc на 49 день у мышей SCID, обработанных анти-MUC16 антителами, конъюгированными с соединением 7

Группа лечения	Среднее конечное излучение опухоли	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
	(среднее ± SEM)	
Носитель	16469750 ± 10679335	0
Контроль -соединение 7 85 мкг/кг	16813750 ± 4026065	-2
Н1Н9519N- Соединение 7 85 мкг/кг	111254 ± 187288	100
Н1Н9521N- Соединение 7 85 мкг/кг	110413 ± 161353	100

Таблица 15B

Ингибирование п/к роста опухоли OVCAR3/luc на 37 день у мышей SCID, обработанных анти-MUC16 антителами, конъюгированными с соединением 7

Группа лечения	Конечный объем опухоли (среднее $\pm$ SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	1210 $\pm$ 426	0
Контроль-Соединение 7 85 мкг/кг	1737 $\pm$ 391	-51
H1N9519N- Соединение 7 85 мкг/кг	187 $\pm$ 269	100
H1N9521N- Соединение 7 85 мкг/кг	89 $\pm$ 97	109

Таблица 15C

Ингибирование в/б роста опухоли OVCAR3/luc на 49 день у мышей SCID, обработанных анти-MUC16 антителами, конъюгированными с соединением 10

Группа лечения	Конечное излучение опухоли (среднее $\pm$ SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	29211000 $\pm$ 23504780	0
Контроль-Соединение 10 85 мкг/кг	17332625 $\pm$ 14346694	41
Контроль-Соединение 10 170 мкг/кг	32075000 $\pm$ 15623403	-10
Контроль-Соединение 10 340 мкг/кг	22882350 $\pm$ 18771913	22
H1N9521N- Соединение 10 85 мкг/кг	574285 $\pm$ 306844	99
H1N9521N- Соединение 10 170 мкг/кг	236037 $\pm$ 226948	100
H1N9521N- Соединение 10 340 мкг/кг	26472 $\pm$ 25079	101

Пример 11. Получение анти-CD3 антител.

Анти-CD3 антитела получают иммунизацией сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую человеческий иммуноглобулин тяжелой и каппа легкой цепи переменных участков с клетками, экспрессирующими CD3, или с ДНК, кодирующей CD3. Иммунный ответ антител наблюдали с помощью CD3-специфического иммуноанализа. Когда желаемый иммунный ответ был достигнут, спленциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и образовать линии клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют CD3-специфические антитела. Используя эту методику, было получено несколько химерных анти-CD3 антител (то есть антител, обладающих человеческими переменными доменами и константными доменами мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих анти-CD3 антител были выделены непосредственно из антиген-позитивных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

Некоторые биологические свойства иллюстративных анти-MUC16 антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, приведенных в данном документе.

Пример 12. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот переменного участка тяжелой и легкой цепей.

В табл. 16 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных участков и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных анти-MUC16 антител по данному изобретению. Соответ-

ствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 17. Способы получения анти-CD3 антител, описанных в данном документе, также можно найти в публикации США 2014/0088295.

Таблица 16

## Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	402	404	406	408	410	412	414	416
H1M2692N	418	420	422	424	426	428	430	432
H1M3542N	434	436	438	440	442	444	446	448
H1M3544N	450	452	454	456	458	460	462	464
H1M3549N	466	468	470	472	474	476	478	480
H1M3613N	482	484	486	488	490	492	494	496
H2M2689N	498	500	502	504	506	508	510	512
H2M2690N	514	516	518	520	522	524	526	528
H2M2691N	530	532	534	536	538	540	542	544
H2M2704N	546	548	550	552	554	556	558	560
H2M2705N	562	564	566	568	570	572	574	576
H2M2706N	578	580	582	584	586	588	590	592
H2M2707N	594	596	598	600	602	604	606	608
H2M2708N	610	612	614	616	618	620	622	624
H2M2709N	626	628	630	632	634	636	638	640
H2M2710N	642	644	646	648	650	652	654	656
H2M2711N	658	660	662	664	666	668	670	672
H2M2774N	674	676	678	680	682	684	686	688
H2M2775N	690	692	694	696	698	700	702	704
H2M2776N	706	708	710	712	714	716	718	720
H2M2777N	722	724	726	728	730	732	734	736
H2M2778N	738	740	742	744	746	748	750	752
H2M2779N	754	756	758	760	762	764	766	768
H2M2789N	770	772	774	776	778	780	782	784
H2M2862N	786	788	790	792	794	796	798	800
H2M2885N	802	804	806	808	810	812	814	816
H2M2886N	818	820	822	824	826	828	830	832
H2M3540N	834	836	838	840	842	844	846	848
H2M3541N	850	852	854	856	858	860	862	864
H2M3543N	866	868	870	872	874	876	878	880
H2M3547N	882	884	886	888	890	892	894	896
H2M3548N	898	900	902	904	906	908	910	912
H2M3563N	914	916	918	920	922	924	926	928
H1H5751P	930	932	934	936	938	940	942	944

## 045730

H1H5752P	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5753B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5754B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5755B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008
H1H5756B	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5757B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040
H1H5758B	1042	1044	1046	1048	1050	1052	1054	1056
H1H5761P	1058	1060	1062	1064	1066	1068	1070	1072
H1H5763P	1074	1076	1078	1080	1082	1084	1086	1088
H1H5764P	1090	1092	1094	1096	1098	1100	1102	1104
H1H5769P	1106	1108	1110	1112	1114	1116	1118	1120
H1H5771P	1122	1124	1126	1128	1130	1132	1134	1136
H1H5772P	1138	1140	1142	1144	1146	1148	1150	1152
H1H5777P	1154	1156	1158	1160	1162	1164	1166	1168
H1H5778P	1170	1172	1174	1176	1178	1180	1182	1184
H1H5780P	1186	1188	1190	1192	1194	1196	1198	1200
H1H5781P	1202	1204	1206	1208	1210	1212	1214	1216
H1H5782P	1218	1220	1222	1224	1226	1228	1230	1232
H1H5785B	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1246	1248
H1H5786B	1250	1252	1254	1256	1258	1260	1262	1264
H1H5788P	1266	1268	1270	1272	1274	1276	1278	1280
H1H5790B	1282	1284	1286	1288	1290	1292	1294	1296
H1H5791B	1298	1300	1302	1304	1306	1308	1310	1312
H1H5792B	1314	1316	1318	1320	1322	1324	1326	1328
H1H5793B	1330	1332	1334	1336	1338	1340	1342	1344
H1H5795B	1346	1348	1350	1352	1354	1356	1358	1360
H1H5796B	1362	1364	1366	1368	1370	1372	1374	1376
H1H5797B	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392
H1H5798B	1394	1396	1398	1400	1402	1404	1406	1408
H1H5799P	1410	1412	1414	1416	1418	1420	1422	1424
H1H5801B	1426	1428	1430	1432	1434	1436	1438	1440
H1H7194B	1442	1444	1446	1448	1634	1636	1638	1640
H1H7195B	1450	1452	1454	1456	1634	1636	1638	1640
H1H7196B	1458	1460	1462	1464	1634	1636	1638	1640
H1H7198B	1466	1468	1470	1472	1634	1636	1638	1640
H1H7203B	1474	1476	1478	1480	1634	1636	1638	1640
H1H7204B	1482	1484	1486	1488	1634	1636	1638	1640

H1H7208B	1490	1492	1494	1496	1634	1636	1638	1640
H1H7211B	1498	1500	1502	1504	1634	1636	1638	1640
H1H7221B	1506	1508	1510	1512	1634	1636	1638	1640
H1H7223B	1514	1516	1518	1520	1634	1636	1638	1640
H1H7226B	1522	1524	1526	1528	1634	1636	1638	1640
H1H7232B	1530	1532	1534	1536	1634	1636	1638	1640
H1H7233B	1538	1540	1542	1544	1634	1636	1638	1640
H1H7241B	1546	1548	1550	1552	1634	1636	1638	1640
H1H7242B	1554	1556	1558	1560	1634	1636	1638	1640
H1H7250B	1562	1564	1566	1568	1634	1636	1638	1640
H1H7251B	1570	1572	1574	1576	1634	1636	1638	1640
H1H7254B	1578	1580	1582	1584	1634	1636	1638	1640
H1H7258B	1586	1588	1590	1592	1634	1636	1638	1640
H1H7269B	1594	1596	1598	1600	1634	1636	1638	1640
H1H7279B	1602	1604	1606	1608	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G	1610	1612	1614	1616	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G3	1618	1620	1622	1624	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G5	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640

Таблица 17

## Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	401	403	405	407	409	411	413	415
H1M2692N	417	419	421	423	425	427	429	431
H1M3542N	433	435	437	439	441	443	445	447
H1M3544N	449	451	453	455	457	459	461	463
H1M3549N	465	467	469	471	473	475	477	479
H1M3613N	481	483	485	487	489	491	493	495
H2M2689N	497	499	501	503	505	507	509	511
H2M2690N	513	515	517	519	521	523	525	527
H2M2691N	529	531	533	535	537	539	541	543
H2M2704N	545	547	549	551	553	555	557	559
H2M2705N	561	563	565	567	569	571	573	575
H2M2706N	577	579	581	583	585	587	589	591
H2M2707N	593	595	597	599	601	603	605	607

## 045730

H2M2708N	609	611	613	615	617	619	621	623
H2M2709N	625	627	629	631	633	635	637	639
H2M2710N	641	643	645	647	649	651	653	655
H2M2711N	657	659	661	663	665	667	669	671
H2M2774N	673	675	677	679	681	683	685	687
H2M2775N	689	691	693	695	697	699	701	703
H2M2776N	705	707	709	711	713	715	717	719
H2M2777N	721	723	725	727	729	731	733	735
H2M2778N	737	739	741	743	745	747	749	751
H2M2779N	753	755	757	759	761	763	765	767
H2M2789N	769	771	773	775	777	779	781	783
H2M2862N	785	787	789	791	793	795	797	799
H2M2885N	801	803	805	807	809	811	813	815
H2M2886N	817	819	821	823	825	827	829	831
H2M3540N	833	835	837	839	841	843	845	847
H2M3541N	849	851	853	855	857	859	861	863
H2M3543N	865	867	869	871	873	875	877	879
H2M3547N	881	883	885	887	889	891	893	895
H2M3548N	897	899	901	903	905	907	909	911
H2M3563N	913	915	917	919	921	923	925	927
H1H5751P	929	931	933	935	937	939	941	943
H1H5752P	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5753B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5754B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5755B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007
H1H5756B	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023
H1H5757B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H5758B	1041	1043	1045	1047	1049	1051	1053	1055
H1H5761P	1057	1059	1061	1063	1065	1067	1069	1071
H1H5763P	1073	1075	1077	1079	1081	1083	1085	1087
H1H5764P	1089	1091	1093	1095	1097	1099	1101	1103
H1H5769P	1105	1107	1109	1111	1113	1115	1117	1119
H1H5771P	1121	1123	1125	1127	1129	1131	1133	1135
H1H5772P	1137	1139	1141	1143	1145	1147	1149	1151

## 045730

H1H5777P	1153	1155	1157	1159	1161	1163	1165	1167
H1H5778P	1169	1171	1173	1175	1177	1179	1181	1183
H1H5780P	1185	1187	1189	1191	1193	1195	1197	1199
H1H5781P	1201	1203	1205	1207	1209	1211	1213	1215
H1H5782P	1217	1219	1221	1223	1225	1227	1229	1231
H1H5785B	1233	1235	1237	1239	1241	1243	1245	1247
H1H5786B	1249	1251	1253	1255	1257	1259	1261	1263
H1H5788P	1265	1267	1269	1271	1273	1275	1277	1279
H1H5790B	1281	1283	1285	1287	1289	1291	1293	1295
H1H5791B	1297	1299	1301	1303	1305	1307	1309	1311
H1H5792B	1313	1315	1317	1319	1321	1323	1325	1327
H1H5793B	1329	1331	1333	1335	1337	1339	1341	1343
H1H5795B	1345	1347	1349	1351	1353	1355	1357	1359
H1H5796B	1361	1363	1365	1367	1369	1371	1373	1375
H1H5797B	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391
H1H5798B	1393	1395	1397	1399	1401	1403	1405	1407
H1H5799P	1409	1411	1413	1415	1417	1419	1421	1423
H1H5801B	1425	1427	1429	1431	1433	1435	1437	1439
H1H7194B	1441	1443	1445	1447	1633	1635	1637	1639
H1H7195B	1449	1451	1453	1455	1633	1635	1637	1639
H1H7196B	1457	1459	1461	1463	1633	1635	1637	1639
H1H7198B	1465	1467	1469	1471	1633	1635	1637	1639
H1H7203B	1473	1475	1477	1479	1633	1635	1637	1639
H1H7204B	1481	1483	1485	1487	1633	1635	1637	1639
H1H7208B	1489	1491	1493	1495	1633	1635	1637	1639
H1H7211B	1497	1499	1501	1503	1633	1635	1637	1639
H1H7221B	1505	1507	1509	1511	1633	1635	1637	1639
H1H7223B	1513	1515	1517	1519	1633	1635	1637	1639
H1H7226B	1521	1523	1525	1527	1633	1635	1637	1639
H1H7232B	1529	1531	1533	1535	1633	1635	1637	1639
H1H7233B	1537	1539	1541	1543	1633	1635	1637	1639
H1H7241B	1545	1547	1549	1551	1633	1635	1637	1639
H1H7242B	1553	1555	1557	1559	1633	1635	1637	1639
H1H7250B	1561	1563	1565	1567	1633	1635	1637	1639
H1H7251B	1569	1571	1573	1575	1633	1635	1637	1639
H1H7254B	1577	1579	1581	1583	1633	1635	1637	1639
H1H7258B	1585	1587	1589	1591	1633	1635	1637	1639
H1H7269B	1593	1595	1597	1599	1633	1635	1637	1639
H1H7279B	1601	1603	1605	1607	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G	1609	1611	1613	1615	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G3	1617	1619	1621	1623	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G5	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639

Антитела обычно упоминаются в данном документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M" и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, "2712", "2692" и т.д., как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "P", "N", или "B". Таким образом, согласно этой номенклатуре, антитело может упоминаться в данном документе, например, как "H1H2712N", "H1M2692N", "H2M2689N" и т.д. Префиксы H1H, H1M и H2M в обозначениях антител, используемых в данном документе, указывают конкретный Fc участок изоформа антитела. Например, антитело "H1H" имеет Fc человеческого IgG1, антитело "H1M" имеет Fc мышиного IgG1, а антитело "H2M" имеет Fc мышиного IgG2 (все переменные участки полностью человеческие, как обозначено первым 'H' в обозначении антител). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изоформ Fc, может быть превращено в антитело с другим изоформом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с человеческим IgG4 и тому подобное), но в любом случае, переменные домены (включая CDR), - которые обозначены численными идентификаторами, приведенными в табл. 1, останутся неизменными, и ожидается, что свойства связывания будут идентичными или практически одинаковыми независимо от природы домена Fc.

Табл. 18 и 19 изложены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных участков тяжелой цепи (табл. 18) и переменных участков легкой цепи (табл. 19), и соответствующие им CDR, дополнительные HCVR и LCVR анти-CD3, полезные в анти-MUC16x анти-CD3 биспецифичных антителах по данному изобретению.

Таблица 18

## Аминокислотные последовательности переменного участка тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1642	1644	1646	1648
CD3-VH-B	1658	1660	1662	1664
CD3-VH-C	1674	1676	1678	1680
CD3-VH-D	1690	1692	1694	1696
CD3-VH-E	1706	1708	1710	1712
CD3-VH-F <sup>#</sup>	1721	1722	1723	1724

Таблица 19

## Аминокислотные последовательности переменного участка легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1650	1652	1654	1656
CD3-VL-B	1666	1668	1670	1672
CD3-VL-C	1682	1684	1686	1688
CD3-VL-D	1698	1700	1702	1704
CD3-VL-E	1714	1716	1718	1720
CD3-VL-F <sup>#</sup>	1725	1726	1727	1728

Переменные участки тяжелой и легкой цепей CD3-VH-F и CD3-VL-F были получены из анти-CD3 антитела, обозначенного "L2K", как указано в WO 2004/106380.

Кроме того, в табл. 20 и 21 изложены идентификаторы последовательностей для нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные участки тяжелой цепи (табл. 20) и переменные участки легкой цепи (табл. 21), и их соответствующие CDR, дополнительные HCVR и LCVR анти-CD3, полезные в анти-MUC16 x анти-CD3 биспецифичных антителах по данному изобретению.

Таблица 20

Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности переменного участка тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1641	1643	1645	1647
CD3-VH-B	1657	1659	1661	1663
CD3-VH-C	1673	1675	1677	1679
CD3-VH-D	1689	1691	1693	1695
CD3-VH-E	1705	1707	1709	1711

Таблица 21

Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности переменного участка легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1649	1651	1653	1655
CD3-VL-B	1665	1667	1669	1671
CD3-VL-C	1681	1683	1685	1687
CD3-VL-D	1697	1699	1701	1703
CD3-VL-E	1713	1715	1717	1719

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах.

Различные контрольные конструкции (анти-CD3 антитела), были включены в следующие эксперименты для сравнительных целей: "ОКТ-3", мышинные моноклональные антитела против антигенов Т-клеточной поверхности человека можно получить от Американской коллекции типовых культур (ATCC) по каталогу №. CRL-8001; и "SP34", коммерчески доступное мышинное моноклональное антитело, получено от, например, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния (Кат. № 302914) или BD Pharmagen, Cat. 55052, реагирует против эpsilon-цепи комплекса T3 на клетках Т-лимфоцитов человека.

Пример 13. Получение дополнительных анти-CD3 антител.

Следующие процедуры были предназначены для определения антител, которые специфически распознают CD3 (ко-рецептор Т-клетки) в качестве антигена.

Пул анти-CD3 антител был получен от генетически модифицированной мыши. Вкратце, мышей иммунизировали антигеном CD3 и генерировали В-клетки, которые содержали множество перестроек VH человека, чтобы экспрессировать разнообразный репертуар высокоаффинных антиген-специфических антител.

Антитела, описанные в табл. 22-25, имеют одинаковую последовательность легкой цепи VK1-39JK5 (LCVR представлены в SEQ ID NO: 1890).

Генерируемые антитела были протестированы на связывание с антигеном CD3 человека и обезьяны яванского макака в *in vitro* анализе связывания, и, например, было идентифицировано одно CD3-антитело: обозначенное CD3-VH-P (HCVR, представленное в SEQ ID NO: 1882), среди нескольких других, которые, как было обнаружено, связываются как с CD3 человека, так и яванского макака, имеющими связывание EC<sub>50</sub> между 1 и 40 нМ (или титрование связывания клеток), как определено в титровании FACS клеток Jurkat и Т-клеток яванского макака соответственно; см. также, например, эксперименты по связыванию FACS, описанные в примере 15 и в PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 г.

Затем были идентифицированы аминокислотные остатки зародышевой линии CD3-VH-P (перегруппировка V-D-J для CD3-VH-P представляет собойIGHV3-9\*01, IGHJ6\*02, IGHD5-12\*01) и антитело, обозначенное "CD3-VH-G", было разработано, чтобы содержать только каркасы зародышевой линии. Другие производные антител были разработаны с помощью хорошо известных методов молекулярного клонирования для замены аминокислотных остатков ступенчатым образом на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью CD3-VH-P. Каждому производному антитела дается "CD3-VH-G" номер обозначения; см. табл. 18.

В то время как CD3-VH-G и некоторые другие сконструированные антитела сохраняют их связывание, как показано в FACS анализах, несколько анти-CD3 антител не связанных с CD3 человека или яван-

ского макака *in vitro* со слабым или не измеримым связыванием, например, 40 нМ EC50. Аффинность связывания, кинетика связывания и другие биологические свойства для выяснения токсичности и фармакокинетические (фК) профили были впоследствии исследованы для биспецифичных антител, содержащих иллюстративные анти-CD3 антитела, полученные в соответствии со способами этого примера, подробно описанные в примерах, приведенных в данном документе.

Пример 14. Варибельные участки тяжелой и легкой цепей (аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты CDR).

В табл. 22 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности варибельных участков и CDR тяжелой цепи выбранных анти-MUC16 антител по данному изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 23.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот определяли для каждой последовательности тяжелой цепи антитела.

Каждой тяжелой цепи антитела, полученная из последовательности зародышевой линии (SEQ ID NO: 1910), было присвоено обозначение "G" для последовательной номенклатуры. В табл. 22 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельных участков тяжелой цепи и CDR сконструированных анти-CD3 антител по данному изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 23. Идентификаторы последовательности аминокислоты и нуклеиновой кислоты варибельного участка легкой цепи и CDR также указаны ниже в табл. 24 и 25 соответственно.

Таблица 22

## Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи

Обозначение CD3-VH Антитела	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1730	1732	1734	1736
CD3-VH-G2	1738	1740	1742	1744
CD3-VH-G3	1746	1748	1750	1752
CD3-VH-G4	1754	1756	1758	1760
CD3-VH-G5	1762	1764	1766	1768
CD3-VH-G8	1770	1772	1774	1776
CD3-VH-G9	1778	1780	1782	1784
CD3-VH-G10	1786	1788	1790	1792
CD3-VH-G11	1794	1796	1798	1800
CD3-VH-G12	1802	1804	1806	1808
CD3-VH-G13	1810	1812	1814	1816
CD3-VH-G14	1818	1820	1822	1824
CD3-VH-G15	1826	1828	1830	1832
CD3-VH-G16	1834	1836	1838	1840
CD3-VH-G17	1842	1844	1846	1848
CD3-VH-G18	1850	1852	1854	1856
CD3-VH-G19	1858	1860	1862	1864
CD3-VH-G20	1866	1868	1870	1872
CD3-VH-G21	1874	1876	1878	1880
CD3-VH-P	1882	1884	1886	1888

Таблица 23

## Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи

Обозначение CD3-VH Антитела	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1729	1731	1733	1735
CD3-VH-G2	1737	1739	1741	1743
CD3-VH-G3	1745	1747	1749	1751
CD3-VH-G4	1753	1755	1757	1759
CD3-VH-G5	1761	1763	1765	1767
CD3-VH-G8	1769	1771	1773	1775
CD3-VH-G9	1777	1779	1781	1783
CD3-VH-G10	1785	1787	1789	1791
CD3-VH-G11	1793	1795	1797	1799
CD3-VH-G12	1801	1803	1805	1807
CD3-VH-G13	1809	1811	1813	1815
CD3-VH-G14	1817	1819	1821	1823
CD3-VH-G15	1825	1827	1829	1831
CD3-VH-G16	1833	1835	1837	1839
CD3-VH-G17	1841	1843	1845	1847
CD3-VH-G18	1849	1851	1853	1855
CD3-VH-G19	1857	1859	1861	1863
CD3-VH-G20	1865	1867	1869	1871
CD3-VH-G21	1873	1875	1877	1879
CD3-VH-P	1881	1883	1885	1887

Таблица 24

## Идентификаторы аминокислотной последовательности легкой цепи

Обозначение Антитела	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1890	1892	1894	1896

Таблица 25

## Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи

Обозначение Антитела	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1889	1891	1893	1895

Антитело контроля 1, обозначенное "CD3-L2K", было сконструировано на основе известного анти-CD3 антитела (то есть анти-CD3 антитела "L2K", как указано в WO 2004/106380).

Антитело изотипического контроля, упомянутое в приведенных в данном документе примерах, представляет собой изотип соответствующий (модифицированный IgG4) антителу, которое взаимодействует с посторонним антигеном, т.е. антигеном Fe1D1.

Пример 15. Исследования *in vitro* и *in vivo* на человеческих моноклональных анти-CD3 антителах.

Исследования *in vivo* и *in vitro* человеческих моноклональных анти-CD3 антител проводили, как описано в публикации США 2014/0088295, опубликованной 27 марта 2014 г., и в PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 г., которые тем самым включены в качестве ссылки.

Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела по данному изобретению связывают растворимый гетеродимерный белок CD3 либо в антитело-захват или антиген-захват форматах, с высокой аффинностью. Растворимый гетеродимерный белок CD3 (hCD3-эпсилон/hCD3-дельта; SEQ ID NO: 1900/1901) получали либо с меткой Fc человека (hFcΔAdp/hFc; SEQ ID NO: 1931/1932), либо с меткой Fc мыши (mFcΔAdp/mfc; SEQ ID NO: 1933/1934). Гетеродимерный белок CD3 очищали с использованием

способа, описанного в Davis et al. (US2010/0331527).

Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела по данному изобретению связывали с Т-клетками человека и индуцируют пролиферацию Т-клеток. Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела по данному изобретению связывали с CD2+CD4+ Т-клетками обезьяны и индуцировали их пролиферацию. Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела поддерживали перенаправленное опосредованное Т-клетками уничтожение посредством взаимодействия Fc/FcR в анализе уничтожения U937 на основе кальцеина. Наблюдаемое уничтожение, которое, как полагают, зависит от взаимодействия Fc антитела с рецептором Fc на клетках U937, приводящего к кластеризации CD3 на соседних Т-клетках, подавляли путем добавления неспецифического человеческого IgG (данные не показаны). Активируется широкий спектр биспецифичных антител, сконструированных с использованием вариантов анти-CD3 плеча, описанных в данном документе (в частности, анти-CD3 плечи, основанные на тяжелой цепи CD3-VH-P, полученной из IGHV3-9\*01, IGHJ6\*02, IGHD5-12\*01) клеток РВМС человека и РВМС обезьяны, и проявляют цитотоксическую активность в линиях клеток, экспрессирующих опухолевый антиген.

Пример 16. Скрининг и идентификация моноклональных анти-MUC16 антител, пригодных для иммуногистохимии (ИНС), на образцах, фиксированных формалином и залитых парафином.

Линии опухолевых клеток человека с известными уровнями экспрессии MUC16 были идентифицированы, зафиксированы в 10% нейтральном забуференном формалине и залиты в парафин. Эти линии были использованы для скрининга различных анти-MUC16 антител для выявления кандидатов для исследований ИНС.

Клеточные линии включают следующие MUC16.

Отрицательные линии клеток: HT29 (толстая кишка) и PC3/ATCC родительский (простата); клеточные линии поджелудочной железы с низким или нулевым уровнем MUC16: Capan1 (аденокарцинома поджелудочной железы), HPAC (аденокарцинома поджелудочной железы). Эндогенно MUC16-экспрессирующие клеточные линии включают: OVCAR3 (яичник) и PEO-1 (серозный рак яичника).

Трансфицированные клеточные линии были сконструированы следующим образом: PC3/ATCC (родительская линия рака простаты) клетки трансфицировали для создания PC3/MUC16 "коротких" и PC3/MUC16 "высоких" клеточных линий. Оба конструкта содержат С-концевой домен MUC16 из аминокислот 13810-14507 (из SEQ ID NO: 1899), и это содержит часть домена SEA12, SEA13, SEA14, SEA15, SEA16, С-концевой не-SEA участок, трансмембранный участок и цитоплазматический домен. Кроме того, клетки с высоким уровнем PC3/MUC имеют дополнительные N-концевые аминокислоты 12783-13467 (из SEQ ID NO: 1899), которые включают SEA5 (частичное) через SEA9 и короткий линкер между доменом SEA9 и началом короткого MUC16 конструкта. Это позволяет дифференцировать анти-MUC16 антитела, которые связываются в участке повтора, и антитела, которые связываются с "nub" частью MUC16, примыкающей к мембране, после ферментативного расщепления и высвобождения участков повтора (аналогично части CA125 в MUC16).

Все окрашивание выполнялось на автоокрашивающем устройстве Ventana Discovery XT с использованием стандартных протоколов. Осадок клеток депарафинизировали, оптимизировали извлечение эпитопа, индуцированного нагреванием, блокировали эндогенный биотин и проводили блокирование белка. Антитела наносили вручную в начальной концентрации 10 мкг/мл и также титровали для обеспечения специфичности сигнала. Было проведено сравнение с коммерчески доступным анти-MUC16 антителом (OC-125), которое специфично для повторных участков CA-125 (Roche, Ventana Catalogue# 760-2610), и с отрицательным контролем (отсутствие первичного антитела). Детекцию проводили с использованием ослиного анти-мышьего биотина, а затем пероксидазы стрептавидин-хрена. Конверсия субстрата, диамино-бензидина (DAB) наблюдалась в виде коричневого окрашивания. Образцы контрастировали с гематоксилином для визуализации ядер. Результаты экспериментов с окрашиванием представлены в табл. 26 ниже.

Таблица 26

Связывание анти-MUC16 антител с MUC16-негативными клетками и клетками, экспрессирующими MUC16, или мембранно-проксимальными частями MUC16

Клеточная линия:	HT29	Сарап1	HPAC	OVCAR3	PEO-1	PC3/ATCC родительский	PC3/MUC16 короткий	PC3/MUC16 высокий
H1M7130N	-	-	-	+++	++	-	+++	+++
H2aM7128N	-	-	+	+++	++	-	+++	+++
H2aM7131N	-	-	-	+++	++	-	+++	+++
H2aM7133N	-	-	-	+++	++	-	-	-
H2aM7138N	-	-	+	+++	++	-	+++	+++
H1M9519N	-	NT	NT	+++	+++	NT	-	+++
H3M9525N	-	NT	NT	-	-	NT	-	-
OC-125	-	-	+	+++	++	-	-	+++
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-	-	-

NT - не тестировано.

Четыре из тестируемых антител (H1M7130N, H2aM7128N, H2aM7131N и H2aM7138N) показали положительное связывание с клетками, экспрессирующими "pub" часть MUC16 без повторных участков (PC3/MUC16 короткие). Эти антитела идентифицированы как "pub-связующие". Одно из протестированных антител (H1M9519N) показало положительное связывание с клетками, экспрессирующими повторные участки MUC16 (PC3/MUC16 высокий), но отрицательное связывание с клетками, экспрессирующими только "pub" часть MUC16 (PC3/MUC16 короткий). Это антитело идентифицируется как "повторное связующее", аналогичное коммерчески доступному антителу OC-125. Ожидается, что тестируемые антитела связывают ткани или клетки различного происхождения, имеющие экспрессированные белки и/или белковые фрагменты, как описано в данном документе.

Данное изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления изобретения, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Такие модификации предназначены для попадания в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается в одном или более из пяти мембранно-проксимальных доменов SEA MUC 16 человека (SEQ ID NO: 1899), где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков 14237-14290 последовательности SEQ ID NO: 1899 и содержит определяющие комплементарность участки HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30 и 32 соответственно.

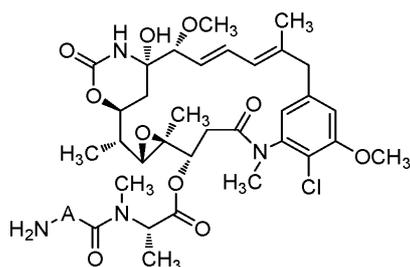
2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) для лечения экспрессирующего MUC16 рака, содержащий анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2 и цитотоксический агент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксический агент ковалентно связаны через линкер.

4. ADC по п.3, где цитотоксический агент выбран из ауристатиона, майтансиноида, тубулистана, производного томаймицина или производного доластатиона.

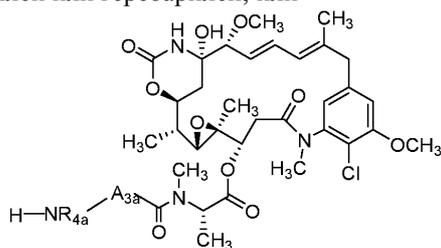
5. ADC по п.3 или 4, где цитотоксический агент представляет собой ауристин, выбранный из MMAE или MMAF, или майтансиноид, выбранный из DM1 или DM4.

6. ADC по п.3 или 4, где цитотоксический агент представляет собой майтансиноид, имеющий структуру



(Формула I),

где А представляет собой арилен или гереоарилен; или



(Формула II),

где  $A_{3a}$  представляет собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетроарил, гетероцикл,  $-CR_5R_6-$ ,  $-O-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)-O-$ ,  $-O-C(=O)-O-$ ,  $-C(=O)-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-C(=O)-O-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-$ ,  $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-O-$ ,  $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$ ,  $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=S)-S-$ ,  $-C(=S)-NH-$ ,  $-S-C(=S)-$ ,  $-S-C(=S)-S-$ ,  $-S-$ ,  $-SO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-NR_4-$ ,  $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$ ,  $-N(R_4)-C(=O)-O-$ ,  $-N(R_4)-C(=O)-$ ,  $-C(=O)-N(R_4)-$ ,  $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$  или  $-O-C(=O)-NR_4-$ , где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероцикл необязательно замещены; и

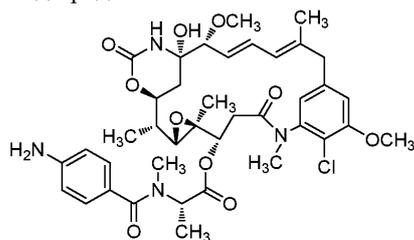
$p1$ ,  $p2$  и  $p3$ , каждый независимо, представляют собой 0 или целое число от 1 до 100;

$x$  представляет собой 0, 1 или 2;

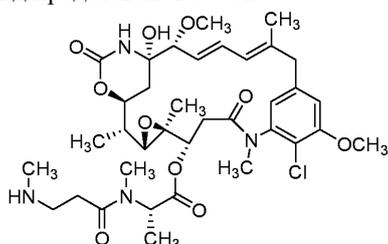
$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_8$ , каждый независимо, представляют собой H или является замещенным или незамещенным алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, гетероарилом или гетероциклилом; и

$R_{4a}$  является замещенным или незамещенным алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, гетероарилом или гетероциклилом.

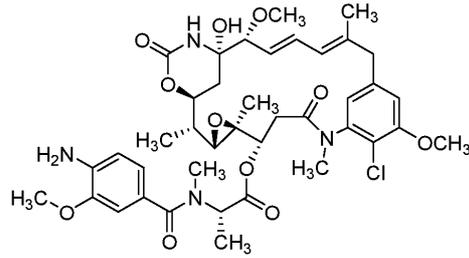
7. ADC по п.6, где майтансиноид представляет собой



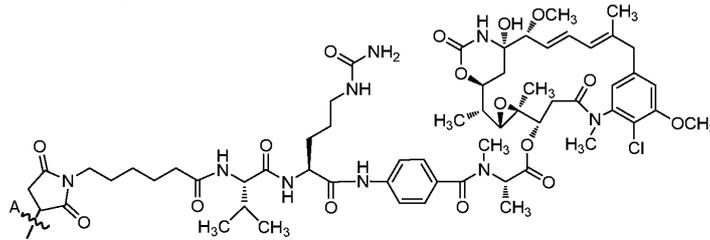
8. ADC по п.6, где майтансиноид представляет собой



9. ADC по п.6, где майтансиноид представляет собой

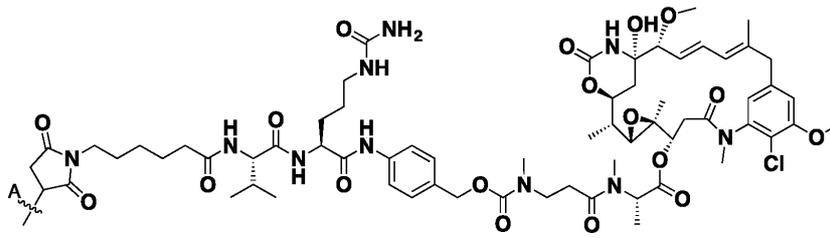


10. ADC по п.3 или 4, содержащий анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



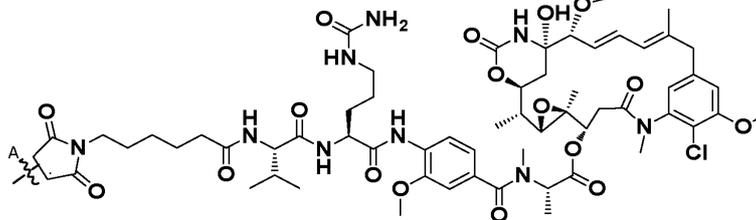
где  $\begin{matrix} A \\ | \\ \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$  является связью с анти-MUC16 антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом.

11. ADC по п.3 или 4, содержащий анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



где  $\begin{matrix} A \\ | \\ \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$  является связью с анти-MUC16 антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом.

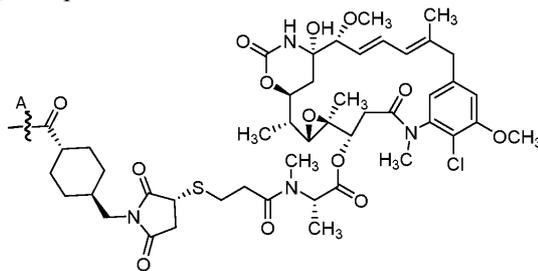
12. ADC по п.3 или 4, содержащий анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



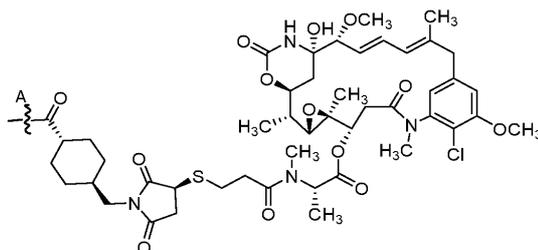
где  $\begin{matrix} A \\ | \\ \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$  является связью с анти-MUC16 антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом.

13. ADC по любому из пп.10-12, где связь контактирует с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через серную составляющую остатка цистеина.

14. ADC по п.3 или 4, содержащий анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



, ИЛИ



, ИЛИ

их смесь,



где  $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{S}}\text{---}$  является связью с анти-MUC16 антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом.

15. ADC по п.14, где связь контактирует с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через азотную составляющую остатка лизина.

16. ADC по любому из пп.3-15, где ADC содержит от 1 до 4 цитотоксических агентов на анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Способ обнаружения MUC16 в биологическом образце, который был получен от субъекта, включающий обнаружение присутствия MUC16 в биологическом образце путем приведения в контакт указанного биологического образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по п.1 или 2 и обнаружения связывания между MUC16 и антителом или антигенсвязывающим фрагментом, где биологический образец представляет собой образец ткани или образец жидкости.

18. Способ по п.17, в котором образец ткани или образец жидкости выбран из плазмы крови, сыворотки крови, асцита, яичника, матки, шейки матки, печени, мочевого пузыря, поджелудочной железы, желудка, тонкого или толстого кишечника, желчного пузыря, молочной железы, легкого, почки, слюнных и слезных желез или любого их злокачественного эпителиоидного образования.

19. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2.

20. Комбинация молекул нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие варибельную область тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и варибельную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1 или 2.

21. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.19.

22. Комбинация экспрессионных векторов, содержащих соответственно комбинацию молекул нуклеиновой кислоты по п.20.

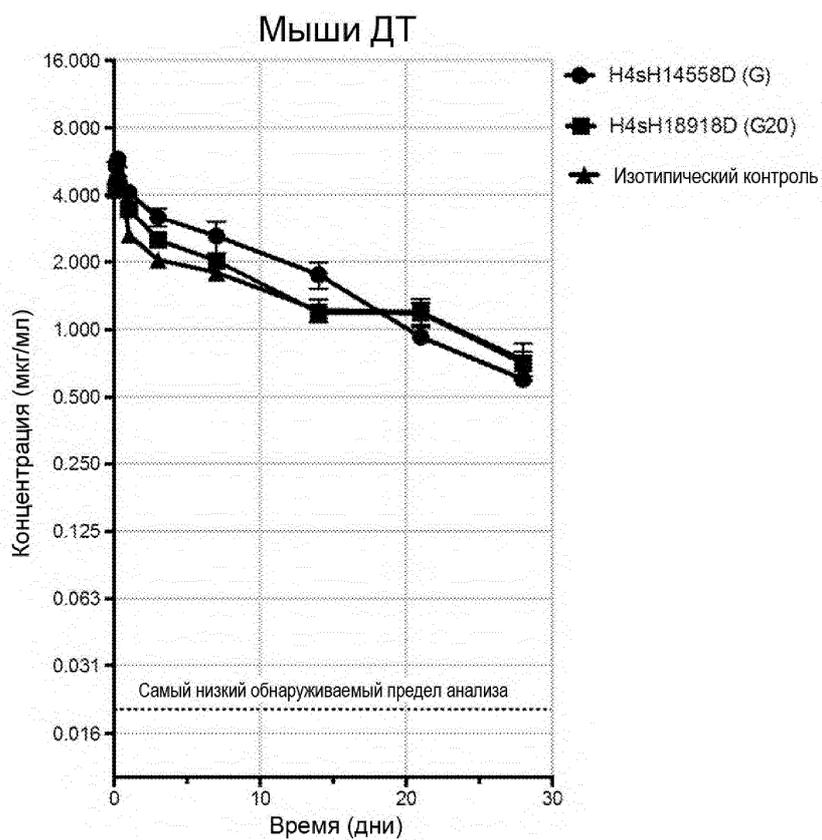
23. Клетка-хозяин, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, молекулу нуклеиновой кислоты по п.19, комбинацию молекул нуклеиновой кислоты по п.20, экспрессионный вектор по п.21 или комбинацию экспрессионных векторов по п.22.

24. Способ получения анти-MUC16 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.23 в условиях, позволяющих получить антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

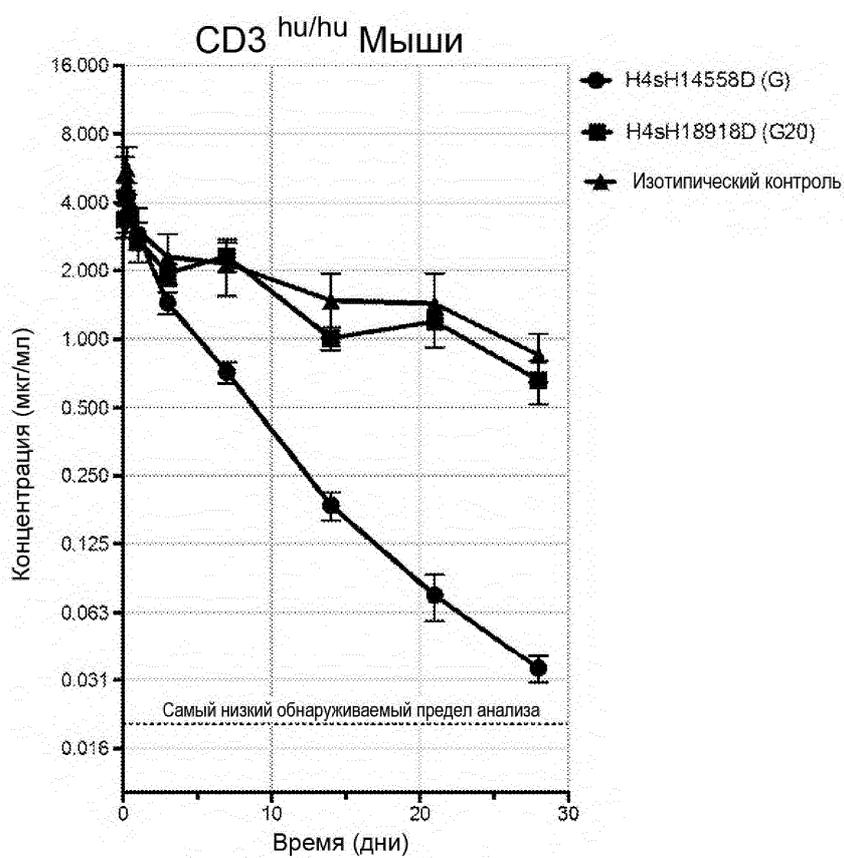
25. Способ по п.24, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка.

26. Способ по п.24 или 25, дополнительно включающий получение состава в качестве фармацевтической композиции, содержащего антитело или антигенсвязывающий фрагмент и подходящий носитель, где фармацевтическую композицию используют для лечения экспрессирующего MUC16 рака.

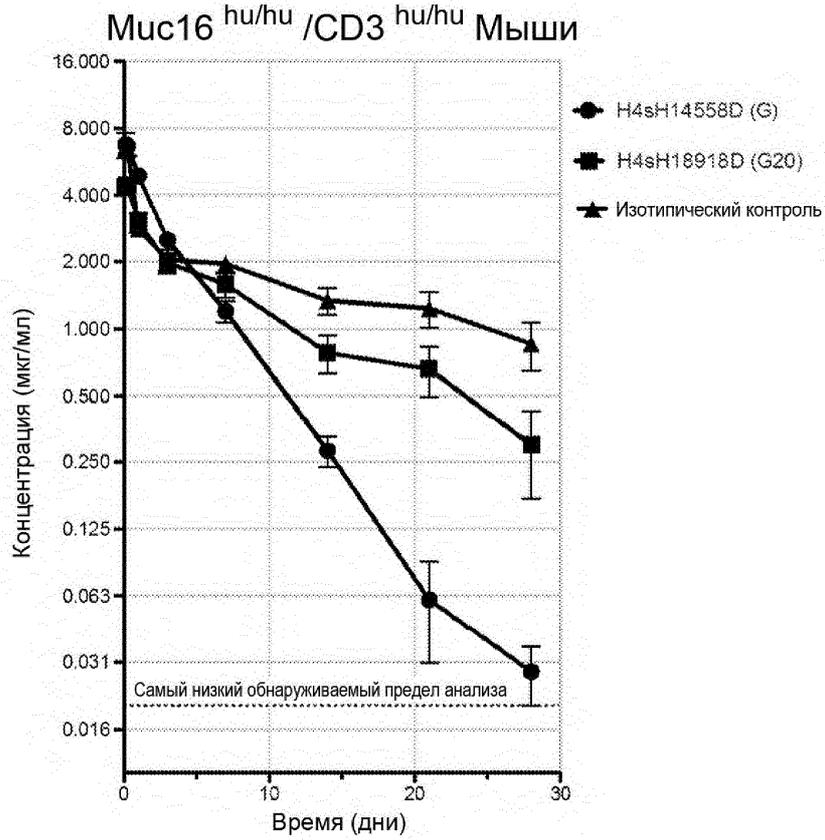
27. Анти-MUC16 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое может быть получено способом по п.24 или 25.



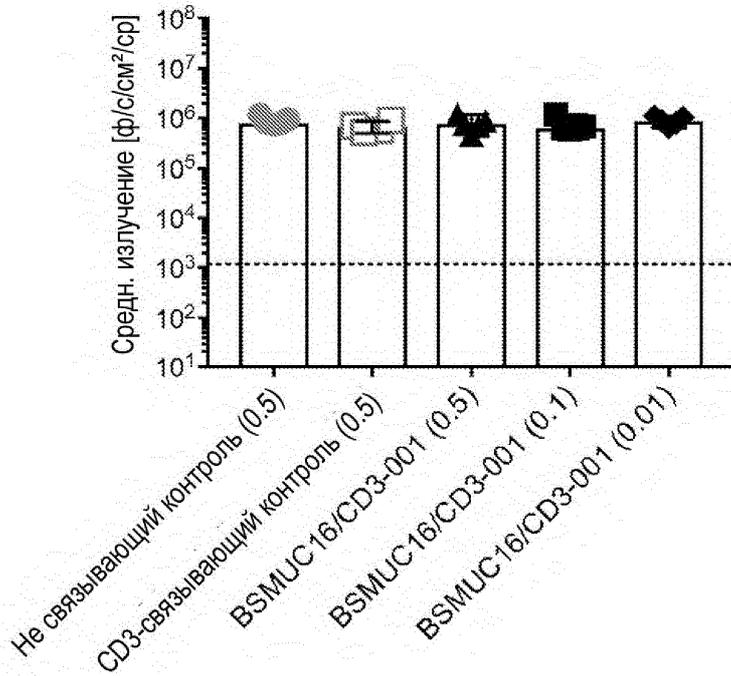
Фиг. 1



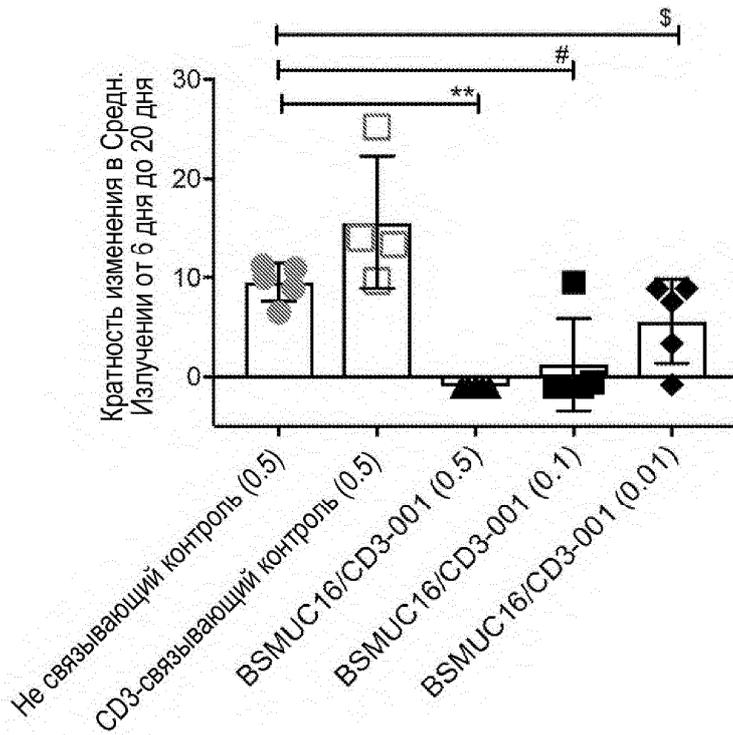
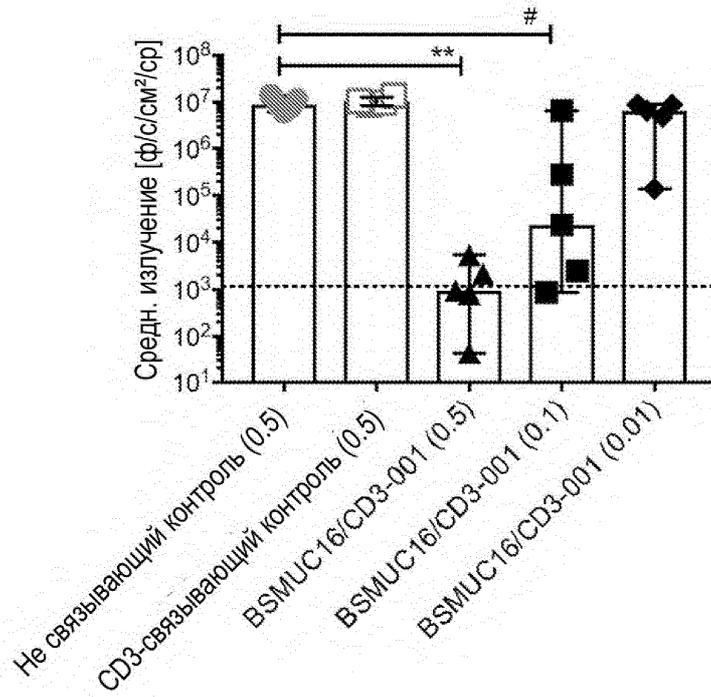
Фиг. 2

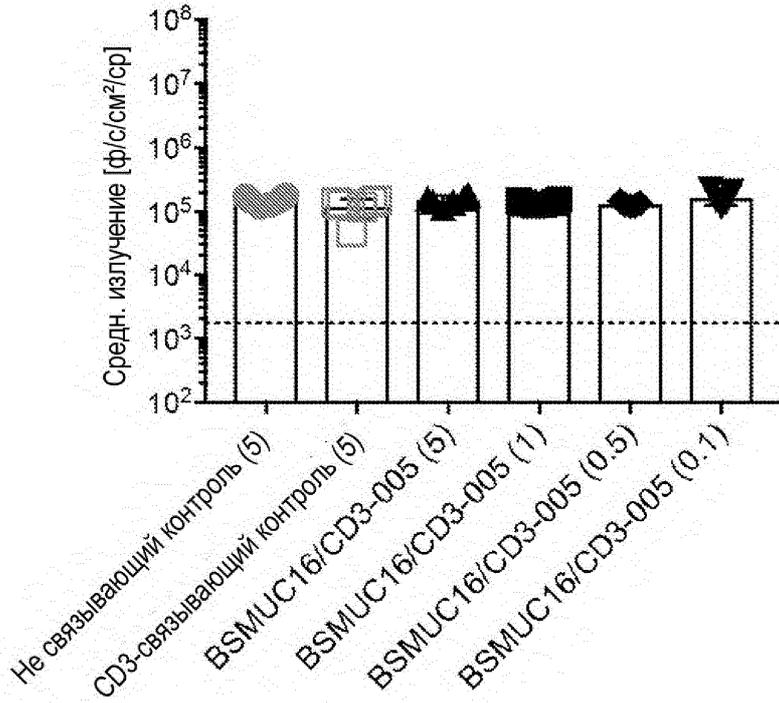


Фиг. 3

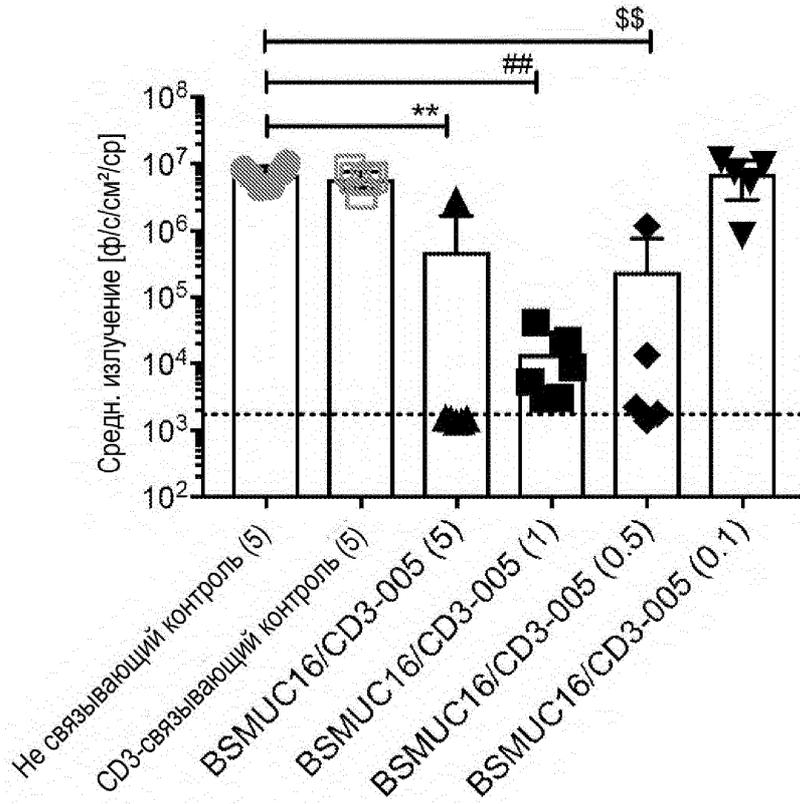


Фиг. 4

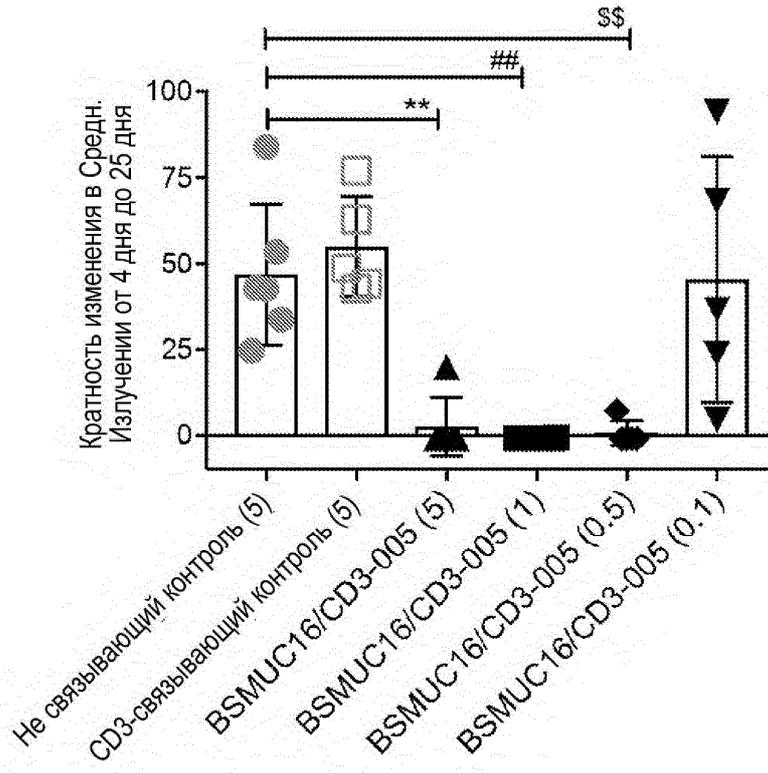




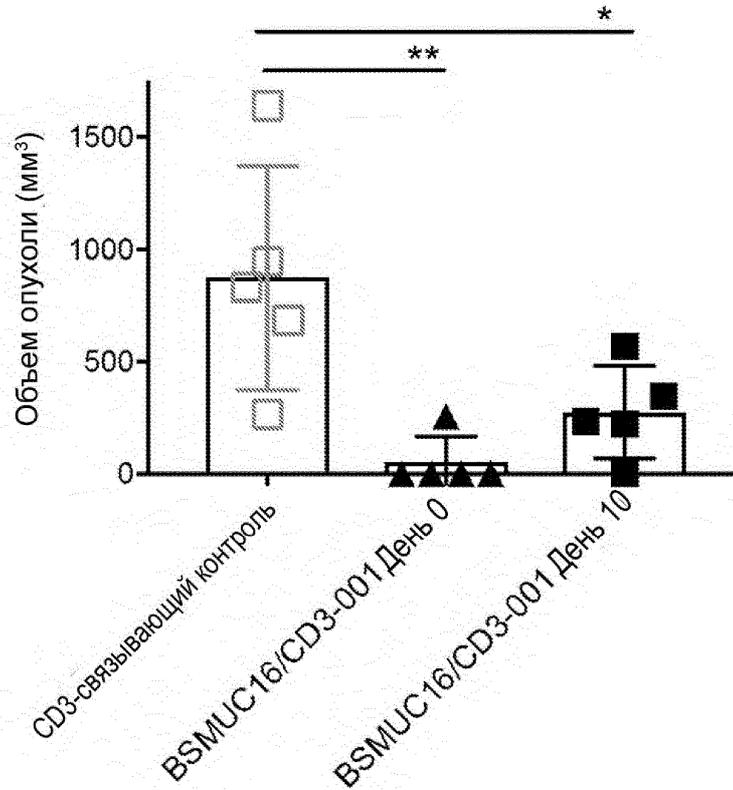
Фиг. 7



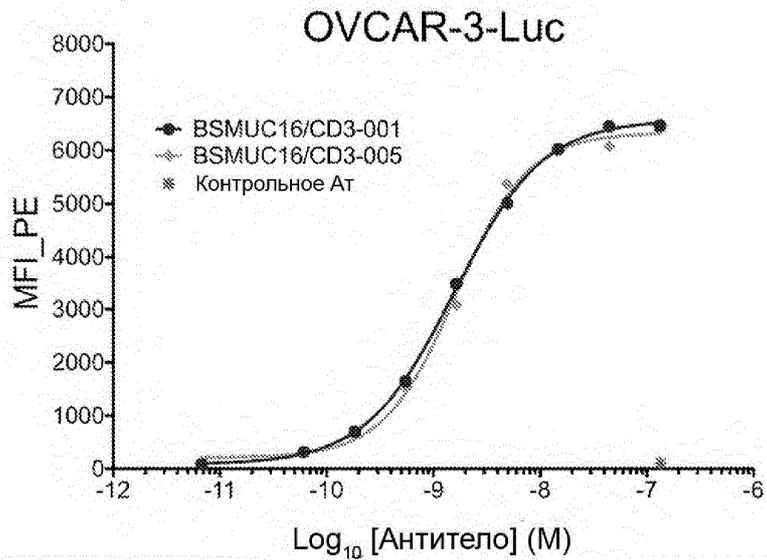
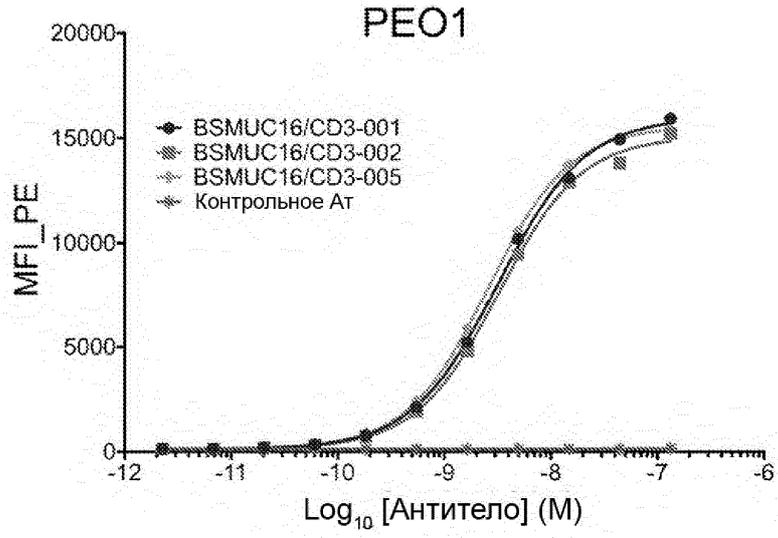
Фиг. 8



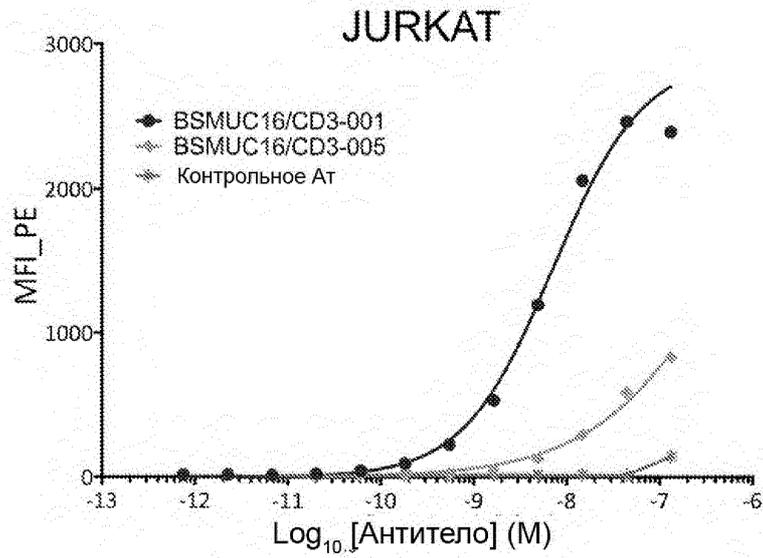
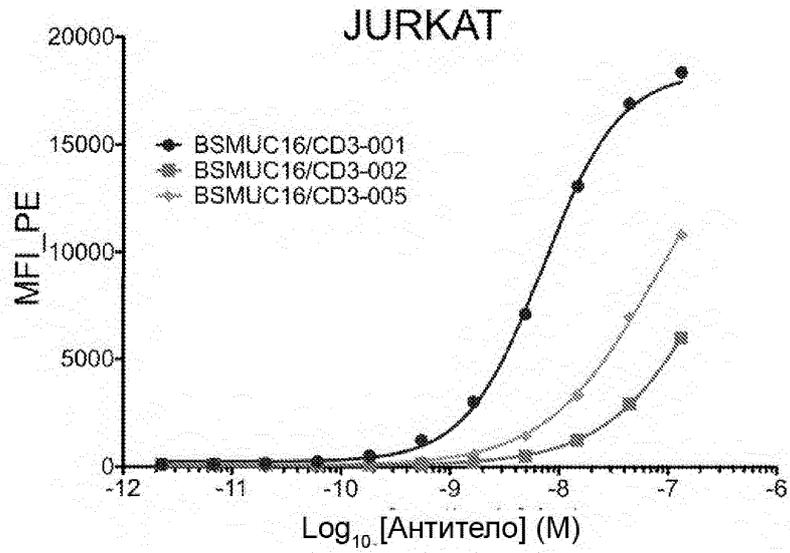
Фиг. 9



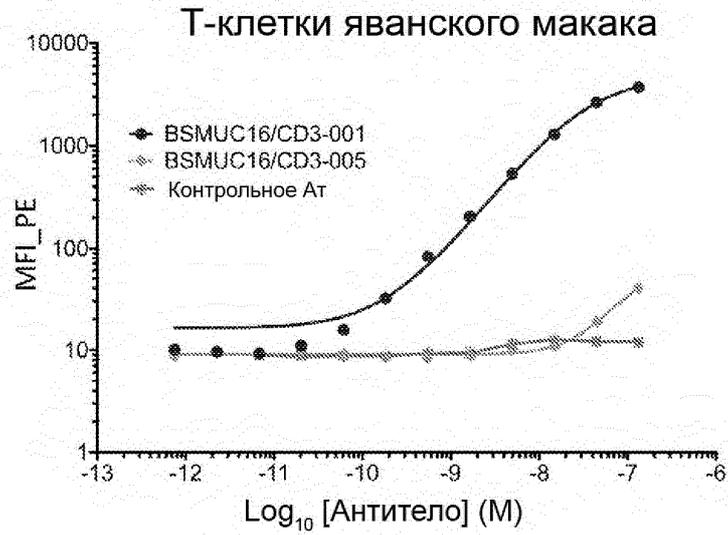
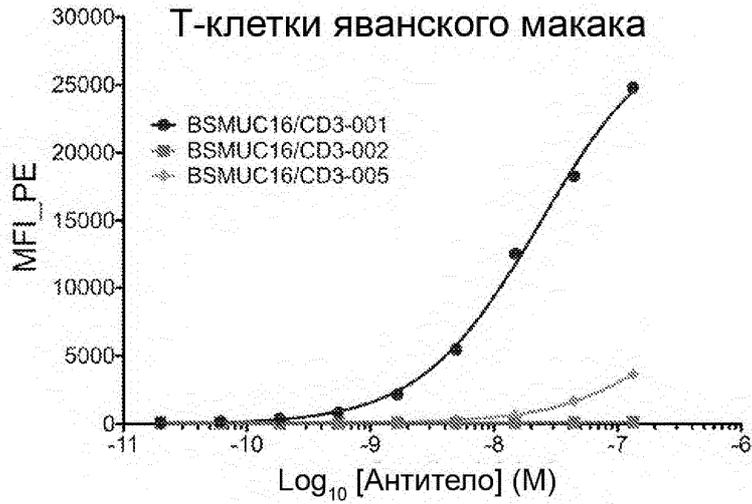
Фиг. 10



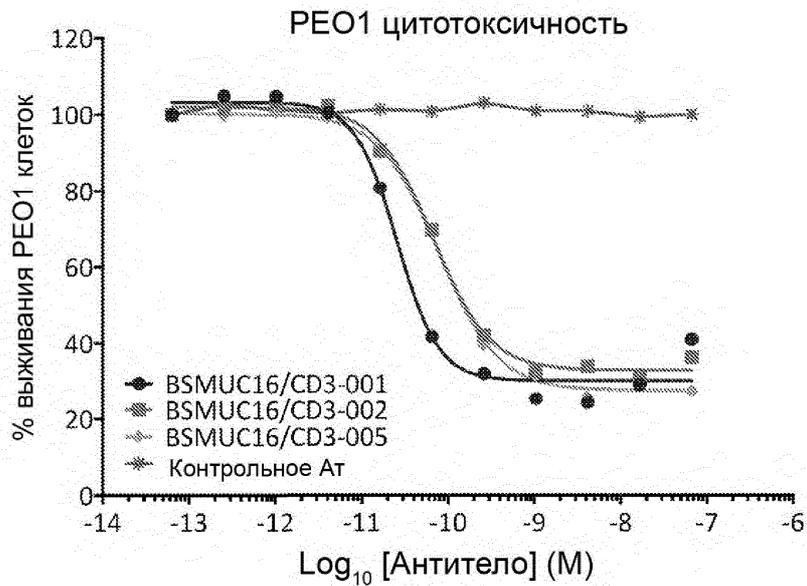
Фиг. 11А



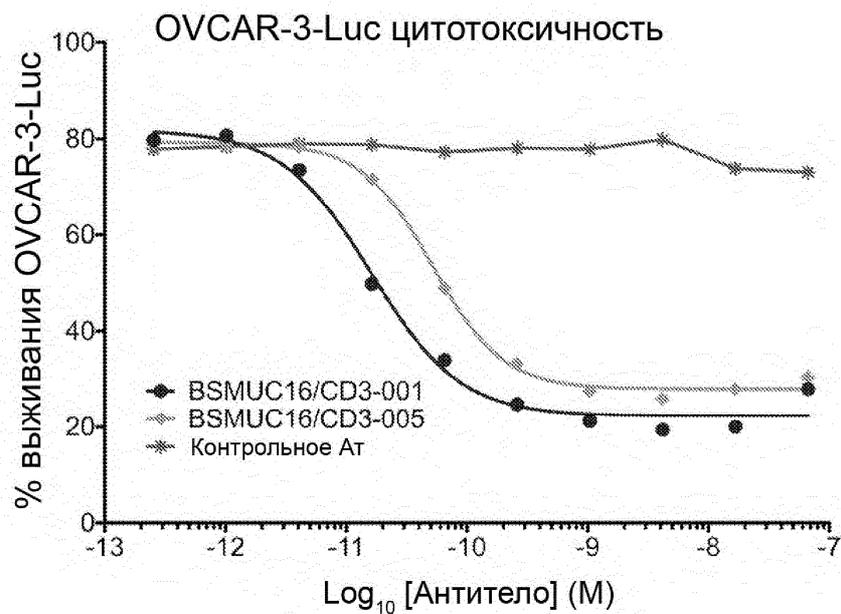
Фиг. 11В



Фиг. 11С



Фиг. 12А



Фиг. 12В

