

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390815 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.25

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.17

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD47-CD38

(31) 20197033.2

(32) 2020.09.18

(33) EP

(86) PCT/EP2021/075687

(87) WO 2022/058539 2022.03.24

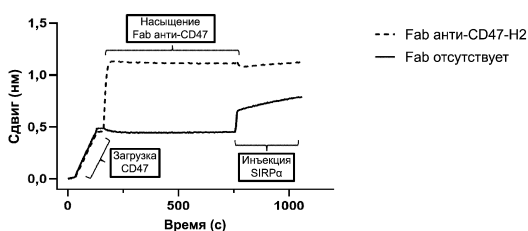
(71) Заявитель:
ИХНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

(72) Изобретатель:

Бушез Лора, Пуло Бландин, Дуси
Мари-Агнес, Дейи Эли, Блейн
Станислас, Штуц Сиан, Эстоппи
Кароль, Луйо Жереми, Монни Тьерри,
Грансельман Камилла, Саммичели
Стефано (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены новые биспецифические гетеродимерные иммуноглобулины, нацеленные на компонент антигена CD47 человека и антигена CD38 человека, и в частности те, которые содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела к CD38 и переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела к CD47. Настоящее изобретение также относится к применению этого нового класса биспецифических гетеродимерных иммуноглобулинов для лечения аутоиммунных и пролиферативных заболеваний и, в частности, рака, такого как гематологические злокачественные новообразования и солидные опухоли.



A1

202390815

202390815

A1

Биспецифические антитела к CD47–CD38

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым биспецифическим гетеродимерным иммуноглобулинам, мишенью которых является компонент антигена CD47 человека и антигена CD38 человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи анти-CD38 и вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи анти-CD47. Настоящее изобретение также относится к применению этого нового класса биспецифических гетеродимерных иммуноглобулинов для лечения аутоиммунных и пролиферативных заболеваний и, в частности, рака, такого как гематологические злокачественные новообразования и солидные опухоли.

10 Предпосылки создания изобретения

Множественная миелома представляет собой неопластическое нарушение функции плазмочитов, характеризующееся клональной пролиферацией злокачественных плазмочитов в микросреде костного мозга (КМ), моноклональным белком в крови или моче и связанным с этим нарушением функции органов. На множественную миелому приходится 1–2% всех впервые диагностированных случаев рака и приблизительно 20% всех летальных исходов при новообразованиях клеток крови. Заболевание несколько чаще наблюдается у мужчин и афроамериканцев. Множественная миелома остается неизлечимой формой рака, несмотря на то что достигнутое в последнее время более глубокое понимание патогенеза миеломы привело к разработке новых вариантов лечения и повышению выживаемости.

Диагностика множественной миеломы требует наличия одного или более событий, определяющих миелому (MDE), в дополнение к наличию либо 10% или более клональных плазмочитов при исследовании КМ, либо подтвержденной биопсией плазмочитомы. MDE включают в себя так называемые признаки CRAB (гиперкальциемию, почечную недостаточность, анемию или литические поражения костей), а также три специфических биомаркера: > 60% клональных плазмочитов КМ, соотношение свободных легких цепей в сыворотке (sFLC) > 100 (при уровне в затронутых sFLC > 100 мг/л) и более 1 очагового поражения по результатам магниторезонансной томографии (МРТ). Ряд генетических аномалий, которые возникают в опухолевых плазмочитах, играет важную роль в патогенезе миеломы и определяют прогноз заболевания.

Неконтролируемый рост клеток миеломы имеет множество последствий, включая разрушение скелета, недостаточность КМ, увеличение объема и вязкости плазмы, подавление нормальной продукции иммуноглобулина и почечную недостаточность.

Лечение симптоматического (активного) заболевания следует проводить незамедлительно, тогда как бессимптомная (вялотекущая) миелома требует только клинического наблюдения, поскольку раннее лечение схемами традиционной химиотерапии на настоящий момент не продемонстрировало очевидных преимуществ. В экспериментальных исследованиях в настоящее время оценивается способность иммуномодулирующих лекарственных средств

- задерживать прогрессирование от бессимптомной миеломы до симптоматической. В случае активной миеломы современные данные свидетельствуют в пользу начала применения схем индукционной терапии, включающих талидомид, леналидомид и/или бортезомиб, с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) после хорошего ответа заболевания у пациентов, которые могут переносить кондиционирующие схемы лечения для ауто-ТГСК. Аспекты в виде физиологического возраста, который может отличаться от хронологического, и наличия сопутствующих заболеваний определяют решения по выбору варианта лечения и дозы лекарственного средства. Например, для пациентов с серьезными сопутствующими заболеваниями, включая сердечно-легочную или печеночную недостаточность, желательны менее интенсивные подходы, ограничивающие смертность, связанную с лечением, и снижающие риск прерывания лечения.
- 5
- 10 Лечение рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы является особой терапевтической проблемой из-за гетерогенности заболевания при рецидиве и отсутствия четких биологически обоснованных рекомендаций относительно выбора вариантов консервативного лечения в различных временных точках прогрессирования заболевания. В условиях растущего понимания роли изначально присущей клональной гетерогенности и геномной нестабильности плазмочитов, влияющих как на изначальную, так и на приобретенную резистентность к лечению,
- 15 критически важное значение приобретает определение оптимального выбора и последовательности вариантов лечения. За последние годы Управление по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов (FDA) Соединенных Штатов Америки (США) одобрило новые лекарственные средства для лечения рецидивирующей/рефрактерной миеломы, в том числе ингибиторы протеасом (карфилзомиб и иксазомиб), производное талидомида помалидомид и ингибитор гистондеацетилазы панобиностат, что дополнительно осложнило принятие подобных решений. В
- 20 настоящее время разрабатываются другие варианты молекулярно-таргетной терапии, нацеленные на специфические сигнальные пути клеток, а также контроль выживаемости и пролиферации (включая ингибиторы PI3K/AKT/mTOR, ингибиторы Hsp90, ингибиторы циклин-зависимой киназы, ингибиторы белка веретена кинезина). Несмотря на успехи в лечении множественной миеломы, рецидив неизбежен практически у всех пациентов. Повторное проявление миеломы, как правило, более агрессивно при каждом рецидиве, что приводит к развитию рефрактерного к лечению
- 25 заболевания, ассоциированного с меньшей выживаемостью. Таким образом, существует потребность в дополнительных вариантах лечения.

- Антитела, мишенями которых являются два разных антигена в одной и той же молекуле, позволяют применять иммунотерапевтическую стратегию лечения для множества новообразований. В доклинических и клинических исследованиях было показано, что наиболее широкий класс антител, перенаправляющих иммунные эффекторны
- 30 клетки, опосредует перенаправление Т-клеток (May C et al., (2012) *Biochem Pharmacol*, 84(9): 1105–12; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013) *Curr Opin Chem Biol*, 17(3): 385–92; Nie et al., (2020) *Antibody Therapeutics*, 3(1), 17–62). Все эффекторные клетки, перенаправляющие биспецифические антитела или их фрагменты, конструируют так, чтобы они имели по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, причем один сайт связывается с поверхностным антигеном на клетке-мишени, а другой сайт связывается с поверхностным антигеном эффекторной клетки.

Тем не менее лекарственные средства на основе антител, перенаправляющих эффекторные клетки, по-прежнему нуждаются в усовершенствованиях, особенно в отношении терапевтического окна. Терапевтическое окно определяется как диапазон концентрации лекарственного средства, который проявляет терапевтическую эффективность без токсичности или при ограниченной наблюдаемой токсичности (Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine, 2014). Целью любой терапии является достижение дозы, при которой эффективность отмечается у всех пациентов, без побочных эффектов или с обратимыми побочными эффектами у любого из пациентов (Principles of Clinical Pharmacology (Third Edition), 2012). Для расширения терапевтического окна биспецифического антитела может быть уменьшена концентрация лекарственного средства, которая обеспечивает полумаксимальный терапевтический ответ (EC50) (повышенная эффективность), и/или может быть увеличена концентрация, которая вызывает токсические эффекты (повышенная целевая специфичность).

Чтобы обеспечить более широкое терапевтическое окно по сравнению с другими одобренными или кандидатными лекарственными препаратами для форм рака со сверхэкспрессией CD38, таких как множественная миелома, авторы изобретения поставили перед собой цель получить более совершенные лекарственные средства на основе антител, перенаправляющие эффекторные клетки, которые обладают специфичным воздействием на опухолевые клетки. Несмотря на то что было показано, что моноклональные антитела, связывающие CD38, такие как дарарумумаб, могут быть использованы в комбинации с CD47-блокирующим scFv, генетически слитым в тандем с нацеленным на CD20 scFv, для повышения фагоцитоза раковых клеток посредством блокирования сигнала CD47/SIRP α (van Bommel, P. E. et al. (2017) CD20-selective inhibition of CD47-SIRP α "don't eat me" signaling with a bispecific antibody-derivative enhances the anticancer activity of daratumumab, alemtuzumab and obinutuzumab. ONCOIMMUNOLOGY, vol. 7, no. 2, 1–8), возможность селективно блокировать взаимодействие CD47-SIRP α в раковых клетках, экспрессирующих CD38, по-прежнему является нереализованной потребностью.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека, причем по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются монопаратопными.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека, причем по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются бипаратопными.

5 Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека, причем по меньшей мере один из связывающих участков, который связывается с CD47 человека, может также связываться с CD47 яванского макака.

10 Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека, причем по меньшей мере один из связывающих участков, который связывается с CD38 человека, может также связываться с CD38 яванского макака.

Настоящее изобретение также относится к упомянутому выше биспецифическому антителу для применения в качестве лекарственного средства.

15 В частности, для применения при лечении множественной миеломы, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, рака молочной железы, такого как Her2-положительный рак молочной железы, рака предстательной железы, рака шейки матки, лимфомы В-клеток герминативного центра или В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), высокозлокачественной серозной карциномы яичников, перитонеального рака.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения раскрываемое биспецифическое антитело содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержащий набор CDR, выбранный из группы, включающей:

25 SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения раскрываемое биспецифическое антитело содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержащий набор CDR, включающий: SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195.

30 В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит область Fc. В частности, указанная область Fc представляет собой вариант, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно области Fc родительского антитела, при этом антитело,

содержащее вариантную область Fc, демонстрирует измененную эффекторную функцию по сравнению с родительским антителом.

5 В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, обладающий аффинностью к CD47 человека меньше аффинности по меньшей мере одного связывающего участка, который связывается с CD38 человека, к CD38 человека.

Настоящее изобретение также относится к эпитопу на внеклеточном домене CD38 человека, который связан биспецифическим антителом, раскрываемым в настоящем документе.

10 Настоящее изобретение также относится к эпитопу на внеклеточном домене CD47 человека, который связан биспецифическим антителом, раскрываемым в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей биспецифическое антитело, раскрываемое в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело, раскрываемое в настоящем документе.

15 Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело, раскрываемое в настоящем документе, или вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело, раскрываемое в настоящем документе.

20 Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель, и к указанной композиции, дополнительно содержащей другой фармацевтически активный агент.

Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгату, содержащему биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, связанное с терапевтическим агентом.

25 Если не указано иное, следующие термины при применении в соответствии с настоящим описанием необходимо понимать следующим образом. За исключением случаев, когда из контекста явно следует иное, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном — единственное. В настоящем описании и в прилагаемых пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают обозначения множественного числа, если иное четко не следует из содержания. Так, например, ссылка на «молекулу» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и т. п.

30 Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления настоящего описания, приведенные в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу из» аспектов и вариантов осуществления.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем документе, относится к одноцепочечным или двухцепочечным полимерам нуклеиновых кислот длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды, содержащие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды либо модифицированную форму любого типа нуклеотида. Такие модификации включают в себя модификации оснований, такие как бромурин, модификации рибозы, такие как арабинозид и 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфоанолиотиоат, фосфоранилат и фосфоамидат. Термин «полинуклеотид», в частности, включает в себя одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

«Выделенный полинуклеотид» представляет собой полинуклеотид геномного происхождения, кДНК или синтетического происхождения либо некоторую их комбинацию, который (-ая): (1) не ассоциирован (-а) со всем полинуклеотидом или участком полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид существует в природе, (2) связан (-а) с полинуклеотидом, с которым он не связан (-а) в природе, или (3) не встречается в природе в виде части более протяженной последовательности.

«Выделенный полипептид» представляет собой полипептид, который: (1) не содержит по меньшей мере некоторых других полипептидов, с которыми он обычно обнаруживается, (2) по существу не содержит других полипептидов из одного и того же источника, например, от одного и того же вида, (3) экспрессируется клеткой от разных видов, (4) был отделен от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он ассоциирован в природе, (5) не ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с участками полипептида, с которым «выделенный полипептид» ассоциирован в природе, (6) функционально ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не ассоциирован в природе, или (7) не встречается в природе. Такой выделенный полипептид может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК синтетического происхождения либо любой их комбинацией. Предпочтительно выделенный полипептид по существу не содержит полипептидов или других примесей, обнаруживающихся в его естественной среде, которые будут препятствовать его применению (терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или иному).

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, включает в себя полные антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты или отдельные цепи. Антитела природного происхождения обычно содержат тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну полноразмерную «легкую» цепь (обычно с молекулярной массой приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную «тяжелую» цепь (обычно с молекулярной массой приблизительно 50–70 кДа). Термины «тяжелая цепь» и «легкая цепь», используемые в настоящем документе, относятся к любому полипептиду иммуноглобулина, имеющему последовательность вариабельного домена, достаточную для обеспечения специфичности в отношении целевого антигена. Аминоконцевой участок каждой легкой и тяжелой цепи обычно включает в себя вариабельный домен из приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, который обычно отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок каждой цепи обычно определяет константный домен, отвечающий за эффекторную

функцию. Таким образом, в антителе природного происхождения полипептид иммуноглобулина полноразмерной тяжелой цепи включает переменный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3), причем домен VH находится на амино-конце полипептида, а домен CH3 находится на карбоксильном конце, и полипептид иммуноглобулина полноразмерной легкой цепи включает переменный домен (VL) и константный домен (CL), причем домен VL находится на амино-конце полипептида, а домен CL находится на карбоксильном конце.

Легкие цепи человека обычно классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда, а тяжелые цепи человека обычно классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включающих, без ограничений, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включающие, без ограничений, IgM1 и IgM2. Аналогичным образом IgA подразделяется на подклассы, включающие, без ограничений, IgA1 и IgA2. В пределах полноразмерных легкой и тяжелой цепей переменные и константные домены обычно соединены областью «J», состоящей из приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает в себя область «D», состоящую из приблизительно 10 или более аминокислот. См., например, работу FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2nd ed., 1989), которая включена для всех целей в полном объеме путем ссылки. Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепей обычно образуют антигенсвязывающий сайт. Переменные домены антител природного происхождения обычно демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми определяющими комплементарности областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары обычно выровнены каркасными областями, что может обеспечивать связывание с конкретным эпитопом. От амино-конца до карбоксильного конца переменные домены легкой и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «набор CDR» относится к группе из трех CDR, которые присутствуют в одной переменной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR определяются по-разному в зависимости от различных систем. Система, описанная Кабатом (Kabat et al, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только представляет собой однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой переменной области антитела, но также дает точные границы остатков, определяющие три CDR. Такие CDR могут упоминаться как CDR по Кабату. Чотиа и соавторы (Chothia and Lesk, 1987, J. Mol Biol. 196: 901–17; Chothia et al, 1989, Nature 342: 877–83) обнаружили, что определенные субфрагменты CDR по Кабату принимают почти идентичные конформации пептидного каркаса несмотря на огромное разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Такие субфрагменты были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где «L» и «H» обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи соответственно. Такие области могут упоминаться как CDR по Чотиа с границами, частично совпадающими с CDR по Кабату. Другие границы, определяющие CDR, частично совпадающие с CDR по Кабату, были описаны в работах Radian, 1995, FASEB J. 9: 133–39; MacCallum, 1996, J. Mol. Biol. 262(5): 732–45; и Lefranc, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55–77. Хотя другие определения границ CDR могут не строго соответствовать одной из описанных в настоящем документе систем, они тем не менее будут частично совпадать с CDR по Кабату, хотя могут быть сокращены или удлинены ввиду прогнозирования или экспериментальных наблюдений о том, что конкретные остатки или группы остатков либо даже целые CDR не оказывают существенного

5 влияния на связывание антигена. В методах, используемых в настоящем документе, могут применяться CDR, определяемые в соответствии с любой из этих систем, хотя в определенных вариантах осуществления применяются CDR по Кабату или Чотиа. Идентификация прогнозируемых CDR с использованием аминокислотной последовательности хорошо известна в данной области, см., к примеру, работу Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains" в *Antibody Engineering*, Vol. 2. Kontermann R., Diibel S., eds. Springer-Verlag, Berlin, p. 33–51 (2010). Аминокислотная последовательность тяжелой и/или легкой цепи переменного домена может также анализироваться для идентификации последовательностей CDR посредством других традиционных методов, например, посредством сравнения с известными аминокислотными последовательностями других переменных областей тяжелых и легких цепей, с тем чтобы определить области гипервариабельности последовательности. Пронумерованные последовательности могут сопоставляться визуально или с использованием программы сопоставления, такой как одна из пакета программ CLUSTAL, как описано в работе Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–80. Молекулярные модели традиционно используются для того, чтобы точно определить каркас и области CDR и, таким образом, скорректировать отнесения на основе последовательности. Все такие альтернативные определения включены в объем настоящего изобретения, а последовательности, приведенные в настоящем описании изобретения, не предусматривают исключения альтернативным образом определяемых последовательностей CDR, которые могут содержать только участок последовательностей CDR, приведенных в перечне последовательностей.

20 Термин «Fc», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, содержащей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента, получаемого в результате расщепления антитела или продуцируемого иными способами, как в мономерной, так и в мультимерной форме, и может содержать шарнирную область. Исходный источник иммуноглобулина нативной Fc предпочтительно имеет человеческое происхождение и может представлять собой любой из иммуноглобулинов. Молекулы Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут связываться в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т. е. дисульфидными связями) и нековалентной ассоциации. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами молекул нативной Fc находится в диапазоне от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2 и IgG4). Одним из примеров Fc является дисульфидно связанный димер, получаемый в результате расщепления IgG папаином. Термин «нативная Fc», используемый в настоящем документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

30 Фрагмент F(ab) обычно включает в себя одну легкую цепь и домены VH и CH1 одной тяжелой цепи, причем участок тяжелой цепи VH-CH1 фрагмента F(ab) не может образовывать дисульфидную связь с другим полипептидом тяжелой цепи. Упомянутый в настоящем документе фрагмент F(ab) может также включать в себя одну легкую цепь, содержащую два переменных домена, разделенных аминокислотным линкером, и одну тяжелую цепь, содержащую два переменных домена, разделенных аминокислотным линкером, и домен CH1.

Фрагмент F(ab') обычно включает в себя одну легкую цепь и участок одной тяжелой цепи, который содержит большую часть константной области (между доменами CH1 и CH2), так что между двумя тяжелыми цепями может формироваться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂.

5 Термин «связывающий белок», используемый в настоящем документе, относится к имеющей неприродное происхождение или рекомбинантной или сконструированной молекуле, такой как имеющее неприродное происхождение или рекомбинантное или сконструированное антитело, которая специфически связывается по меньшей мере с одним целевым антигеном, например, полипептидом CD38 или полипептидом CD47 настоящего описания.

«Рекомбинантная» молекула представляет собой молекулу, которая была получена, экспрессирована, создана или выделена посредством рекомбинантных технологий.

10 В одном варианте осуществления настоящего описания предложены связывающие белки, обладающие биологической и иммунологической специфичностью к от одного до трех целевых антигенов. В другом варианте осуществления настоящего описания предложены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные цепи, которые образуют такие связывающие белки. В другом варианте осуществления настоящего описания предложены экспрессионные векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, 15 содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные цепи, которые образуют такие связывающие белки. В еще одном варианте осуществления настоящего описания предложены клетки-хозяева, которые экспрессируют такие связывающие белки (т. е. содержащие молекулы нуклеиновой кислоты или векторы, кодирующие полипептидные цепи, которые образуют такие связывающие белки).

20 Термин «антиген» или «целевой антиген» или «антиген-мишень», используемый в настоящем документе, относится к молекуле или участку молекулы, которая (-ый) способна (способен) связываться со связывающим белком и дополнительно может использоваться у животного для продукции антител, способных связываться с эпитопом такого антигена. Целевой антиген может иметь один или более эпитопов. Что касается каждого целевого антигена, распознаваемого связывающим белком, такой связывающий белок способен конкурировать с интактным антителом, которое распознает целевой антиген. Антиген связывается связывающим белком, таким как антитело, посредством 25 антигенсвязывающего сайта, также упоминаемого в настоящем документе как «связывающий участок» или «связывающий домен».

30 «CD38» представляет собой полипептид кластера дифференцировки 38, гликопротеин, обнаруживаемый на поверхности многих иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания связывается с внеклеточным доменом одного или более полипептидов CD38. Примеры полипептидных последовательностей внеклеточного домена CD38 включают, без ограничений, внеклеточный домен CD38 человека (например, представленный в SEQ ID NO: 5) и внеклеточный домен CD38 яванского макака (например, представленный в SEQ ID NO: 6).

«CD47» представляет собой кластер дифференцировки 47, трансмембранный белок, который у человека кодируется геном CD47. CD47 относится к суперсемейству иммуноглобулинов, он взаимодействует с мембранными интегринами, а также связывает лиганды тромбоспондин-1 (TSP-1) и сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP α). CD47 выполняет функцию сигнала «не ешь меня» для макрофагов иммунной системы. CD47 человека кодируется SEQ ID NO: 7, а CD47 яванского макака кодируется SEQ ID NO: 8.

Термин «моноспецифический связывающий белок» относится к связывающему белку, который специфически связывается с одним целевым антигеном.

Термин «одновалентный связывающий белок» относится к связывающему белку, содержащему один антигенсвязывающий сайт.

10 Термин «биспецифический связывающий белок» относится к связывающему белку, который специфически связывается с двумя различными целевыми антигенами. В некоторых вариантах осуществления биспецифический связывающий белок связывается с двумя различными антигенами. В некоторых вариантах осуществления биспецифический связывающий белок связывается с двумя различными эпитопами на одном и том же антигене.

15 Термин «бивалентный связывающий белок» относится к связывающему белку, содержащему два антигенсвязывающих сайта.

Термин «триспецифический связывающий белок» относится к связывающему белку, который специфически связывается с тремя различными целевыми антигенами. В некоторых вариантах осуществления триспецифический связывающий белок связывается с тремя различными антигенами. В некоторых вариантах осуществления триспецифический связывающий белок связывается с одним, двумя или тремя различными эпитопами на одном и том же антигене.

20 Термин «тривалентный связывающий белок» относится к связывающему белку, имеющему три сайта связывания. В конкретных вариантах осуществления тривалентный связывающий белок может связываться с одним целевым антигеном (т. е. представляет собой «моноспецифический тривалентный связывающий белок»). В других вариантах осуществления тривалентный связывающий белок может связываться с двумя целевыми антигенами (т. е. представляет собой «биспецифический тривалентный связывающий белок»). В других вариантах осуществления тривалентный связывающий белок может связываться с тремя целевыми антигенами (т. е. представляет собой «триспецифический тривалентный связывающий белок»). В более конкретном варианте осуществления тривалентный связывающий белок, который связывается с двумя целевыми антигенами, содержит связывающий участок, который связывается с первым целевым антигеном, и два связывающих участка, которые связываются с одним и тем же эпитопом второго целевого антигена; такой связывающий белок называют «монопаратопным». В другом более конкретном варианте осуществления тривалентный связывающий белок, который связывается с двумя целевыми антигенами, содержит связывающий участок, который связывается с первым целевым антигеном, и два связывающих участка, которые связываются с двумя различными эпитопами второго целевого антигена; такой связывающий белок называют

«бипаратопным». «Выделенный» связывающий белок представляет собой белок, который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из компонента его природной среды. Примесные компоненты его природной среды представляют собой материалы, которые будут влиять на диагностическое или терапевтическое применение связывающего белка и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

- 5 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок будет очищен: (1) более чем на 95% по массе антитела при определении методом Лоури и наиболее предпочтительно более чем на 99% по массе; (2) до уровня, достаточного для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности посредством применения секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до гомогенности посредством электрофореза белков в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания Кумасси синим или предпочтительно серебряным красителем. Выделенные связывающие белки включают в себя связывающий белок *in situ* внутри рекомбинантных клеток, так как по меньшей мере один компонент природной среды связывающего белка будет отсутствовать.

- Термины «по существу чистый» или «по существу очищенный», используемые в настоящем документе, относятся к соединению или компонентам, которые являются преобладающими присутствующими компонентами (т. е. на молярной основе их содержание выше, чем у любых других индивидуальных компонентов в композиции). В некоторых вариантах осуществления по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой компоненты составляют по меньшей мере приблизительно 50% (на молярной основе) всех присутствующих макромолекулярных компонентов. В других вариантах осуществления по существу чистая композиция будет содержать более чем приблизительно 80%, 85%, 90%, 95% или 99% всех присутствующих макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции.
- 20 В других вариантах осуществления компоненты очищают до существенной гомогенности (примесные соединения невозможно обнаружить в композиции традиционными методами детектирования), причем композиция состоит по существу из одного макромолекулярного компонента.

- Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «по существу чистой», если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочью/додецилсульфатом натрия (SDS), бэндинг CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные специалистам в данной области, см., например, F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота изобретения может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности.

- 30 Термин «эпитоп» включает любую детерминанту, предпочтительно полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В определенных вариантах осуществления эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана антителом или связывающим
- 35

белком. В некоторых вариантах осуществления указывается, что связывающий белок специфически связывается с антигеном, если он предпочтительно распознает свой целевой антиген в сложной смеси белков и/или макромолекул. В некоторых вариантах осуществления указывается, что связывающий белок специфически связывается с антигеном, если равновесная константа диссоциации составляет $< 10^8$ М, более предпочтительно, если равновесная константа диссоциации составляет $< 10^9$ М, и наиболее предпочтительно, если равновесная константа диссоциации составляет $< 10^{10}$ М.

Константу диссоциации (KD) связывающего белка можно определить, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Как правило, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса измеряются связывающие взаимодействия в реальном времени между лигандом (целевым антигеном на биосенсорной матрице) и аналитом (связывающим белком в растворе) с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы BIAcore (GE). Поверхностный плазмонный анализ также можно осуществлять посредством иммобилизации аналита (связывающего белка на биосенсорной матрице) и презентирования лиганда (целевого антигена). Термин «KD», используемый в настоящем документе, относится к константе диссоциации взаимодействия между определенным связывающим белком и целевым антигеном.

Термин «связывается с», используемый в настоящем документе в отношении связывающего белка, относится к способности связывающего белка или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с антигеном, содержащим эпитоп, с KD по меньшей мере приблизительно 1×10^6 М, 1×10^7 М, 1×10^8 М, 1×10^9 М, 1×10^{10} М, 1×10^{11} М, 1×10^{12} М или более и/или связываться с эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность к неспецифическому антигену. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания связывается с двумя или более антигенами, например, полипептидом CD38 человека и яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен и/или связывающий белок настоящего описания «перекрестно реагирует» с полипептидами CD38 человека и яванского макака, например, внеклеточными доменами CD38, такими как SEQ ID NO: 295 (изоформа 28907-1 CD38 человека), SEQ ID NO: 294 (изоформа 28907-2 CD38 человека), SEQ ID NO: 296 (изоформа 28907-E CD38 человека) и SEQ ID NO: 6 (CD38 яванского макака). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагирует с CD47 человека (например, SEQ ID NO: 300 (изоформа OA3-323 CD47 человека), SEQ ID NO: 301 (изоформа OA3-293 CD47 человека), SEQ ID NO: 302 (изоформа OA3-305 CD47 человека) и SEQ ID NO: 303 (изоформа OA3-312 CD47 человека)) и CD47 яванского макака. Связывающий белок, связывающийся с антигеном 1, является «перекрестно-реактивным» по отношению к антигену 2, если EC50S находятся в схожем диапазоне для обоих антигенов.

Термин «линкер», используемый в настоящем документе, относится к одному или более аминокислотным остаткам, вставленным между доменами иммуноглобулина для обеспечения достаточной подвижности доменов легкой и тяжелой цепей для фолдинга в иммуноглобулины с двумя перекрестными переменными областями. Линкер вставляют в переходную область между переменными доменами или между переменными и константными доменами соответственно на уровне последовательности. Переходную область между доменами можно будет идентифицировать, поскольку приблизительный размер доменов иммуноглобулина хорошо известен. Как было

продемонстрировано на основе экспериментальных данных или как можно предположить на основе методик моделирования или прогнозирования вторичной структуры, точное расположение переходной области домена можно установить посредством определения положения пептидных цепей, которые не образуют элементы вторичной структуры, такие как бета-листы или альфа-спирали.

5 Термин «вектор», используемый в настоящем документе, относится к любой молекуле (например, нуклеиновой кислоте, плазмиде или вирусу), которая используется для передачи кодирующей информации клетке-хозяину. Термин «вектор» включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора может служить «плазида» — термин, обозначающий кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора
10 представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть вставлены в вирусный геном. Определенные векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Векторы другого типа (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и таким образом реплицируются вместе с геномом клетки-
15 хозяина. Кроме того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «экспрессионными векторами»). В целом экспрессионные векторы, используемые в технологиях рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. Термины «плазида» и «вектор» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее широко используемой формой вектора. Вместе с тем
20 настоящее описание предусматривает включение в себя и других форм экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектом репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Выражение «рекомбинантная клетка-хозяин» (или «клетка-хозяин»), используемое в настоящем документе, относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Под рекомбинантной клеткой-хозяином или
25 клеткой-хозяином следует понимать не только конкретную клетку-субъекта, но и потомство такой клетки. Так как в последующих поколениях могут возникнуть некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство фактически может быть не идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включаются в объем используемого в настоящем документе термина «клетка-хозяин». Для экспрессии связывающих белков можно использовать широкий спектр систем экспрессии клеток-хозяев, включая бактериальные, дрожжевые,
30 бакуловирусные системы экспрессии и системы экспрессии млекопитающих (а также системы экспрессии фагового дисплея). Примером подходящего бактериального экспрессионного вектора является pUC19. Для рекомбинантной экспрессии связывающего белка клетку-хозяина трансформируют или трансфицируют с одним или более рекомбинантными векторами экспрессии, несущими фрагменты ДНК, кодирующие полипептидные цепи связывающего белка, так что полипептидные цепи экспрессируются в клетке-хозяине и предпочтительно
35 секретируются в среду, в которой культивируются клетки-хозяева и из которой можно выделить связывающий белок.

Термин «трансформация», используемый в настоящем документе, относится к изменению генетических характеристик клетки, а клетка считается трансформированной, если она была модифицирована с тем чтобы содержать новую ДНК. Например, клетка трансформирована, если она генетически модифицирована по сравнению с ее нативным состоянием. После трансформации трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки посредством физической интеграции в хромосому клетки или может временно сохраняться в виде эписомного элемента без репликации или может независимо реплицироваться как плаزمид. Клетка считается стабильно трансформированной, если при делении клетки происходит репликация ДНК. Термин «трансфекция», используемый в настоящем документе, относится к захвату чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, а клетка считается «трансфицированной», если экзогенная ДНК была введена внутрь клеточной мембраны. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области. Такие методики можно применять для введения одной или более экзогенных молекул ДНК в подходящие клетки-хозяева.

Термин «природного происхождения», используемый в настоящем документе и применяемый к тому или иному объекту, указывает на тот факт, что такой объект может быть обнаружен в природе и не является результатом деятельности человека. Например, полинуклеотид или полипептид, который присутствует в организме (включая вирусы), который может быть выделен из источника в природе и не был намеренно модифицирован человеком, имеет природное происхождение. Аналогичным образом термин «неприродного происхождения», используемый в настоящем документе, относится к объекту, который не встречается в природе либо который был структурно модифицирован или синтезирован человеком.

В контексте настоящего документа двадцать стандартных аминокислот и их аббревиатуры используются в соответствии со стандартной практикой. Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, не встречающиеся в природе аминокислоты и аналоги, такие как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота и другие нестандартные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидных цепей связывающих белков. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие схожие аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). При обозначении полипептида в настоящем документе левое направление представляет собой направление к амино-концу, а правое направление представляет собой направление к карбоксильному концу в соответствии со стандартной практикой и конвенцией.

Остатки природного происхождения могут подразделяться на классы на основании общих свойств боковой цепи:

- 30 (1) гидрофобные: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- (2) полярные гидрофильные: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
- (3) алифатические: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- (4) алифатические гидрофобные: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- (5) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 35 (6) кислые: Asp, Glu;

(7) основные: His, Lys, Arg;

(8) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(9) ароматические: His, Trp, Tyr, Phe; и

(10) ароматические гидрофобные: Phe, Trp, Tyr.

- 5 Консервативные аминокислотные замены могут включать в себя замену представителя одного из этих классов другим представителем того же класса. Неконсервативные замены могут включать в себя замену представителя одного из этих классов представителем другого класса.

10 Специалист в данной области сможет определить подходящие варианты полипептидных цепей связывающих белков с использованием хорошо известных методик. Например, специалист в данной области может идентифицировать подходящие области полипептидной цепи, которые могут быть изменены без потери активности за счет нацеливания на области, которые не считаются важными для активности. Альтернативно специалист в данной области может идентифицировать остатки и участки молекул, которые являются консервативными среди схожих полипептидов. Кроме того, даже области, которые могут быть важны для биологической активности или для структуры, могут подвергаться консервативным аминокислотным заменам без потери биологической активности или без негативного
15 воздействия на структуру полипептида.

Термин «пациент», используемый в настоящем документе, включает в себя субъектов человека и субъектов животных.

Термины «лечение» или «лечить», используемые в настоящем документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Требующие лечения пациенты включают тех, кто имеет расстройство, а также тех, кто имеет предрасположенность к развитию расстройства, или тех, у кого такое
20 расстройство необходимо предотвратить. В конкретных вариантах осуществления связывающие белки можно применять для лечения людей с раком или людей, предрасположенных к раку, либо для облегчения симптомов рака у субъекта человека. Связывающие белки также можно применять для предотвращения рака у пациента-человека. В конкретных вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, лимфому, рак молочной железы, такой как
25 Her2-положительный рак молочной железы, рак предстательной железы, рак шейки матки, лимфому В-клеток герминативного центра или В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК), высокозлокачественную серозную карциному яичников, перитонеальный рак.

30 Термин «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция», используемый в настоящем документе, относится к соединению или композиции, способным вызывать желаемый терапевтический эффект при надлежащем введении пациенту.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «физиологически приемлемый носитель», используемый в настоящем документе, относится к одному или более материалам состава, подходящим для проведения или повышения эффективности доставки связывающего белка.

5 Термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» при использовании в отношении фармацевтической композиции, содержащей один или более связывающих белков, относятся к количеству или дозировке, достаточной для достижения желаемого терапевтического результата. Более конкретно, терапевтически эффективное количество представляет собой количество связывающего белка, достаточное для ингибирования в течение некоторого периода времени одного или более из клинически определенных патологических процессов, ассоциированных с состоянием, подлежащим лечению. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от используемого специфически связывающего белка, а также зависит от множества факторов и условий, связанных с пациентом, подлежащим лечению, и тяжестью расстройства. Например, если связывающий белок должен вводиться *in vivo*, то среди принимаемых во внимание факторов будут такие факторы, как возраст, масса тела и состояние здоровья пациента, а также кривые зависимости ответа от дозы и данные токсичности, полученные в доклинических исследованиях на животных. Порядок определения эффективного количества или терапевтически эффективного количества той или иной конкретной фармацевтической композиции хорошо известен специалистам в данной области.

В одном варианте осуществления настоящего описания предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество связывающего белка.

Белки, связывающие анти-CD38

20 Определенные аспекты настоящего описания относятся к связывающим белкам, содержащим антигенсвязывающий сайт, который связывает полипептид CD38 (например, полипептиды CD38 человека и яванского макака). В некоторых вариантах осуществления связывающие белки являются моноспецифическими и/или одновалентными, биспецифическими и/или бивалентными, триспецифическими и/или тривалентными либо мультиспецифическими и/или мультивалентными.

25 В настоящем документе описаны различные характеристики примеров моноспецифических, биспецифических или триспецифических связывающих белков. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагирует с CD38 человека (например, SEQ ID NO: 295 (изоформа 28907-1 CD38 человека), SEQ ID NO: 294 (изоформа 28907-2 CD38 человека), SEQ ID NO: 296 (изоформа 28907-E CD38 человека)) и CD38 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок индуцирует апоптоз клетки CD38 +.

30 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок является бивалентным и/или биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок является мультивалентным, например, тривалентным или тетравалентным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из антигенсвязывающих сайтов связывает полипептид CD38 (например, внеклеточный домен полипептидов CD38 человека и/или яванского макака).

В любом из биспецифических связывающих белков, описанных выше, целевым антигеном, отличным от CD38, может быть любой из следующих примеров целевых антигенов: A2AR, APRIL, АТРDаза, BAFF, BAFFR, BCMA, BIYS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (также известный как VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (также известный как MCP-1), CCL3 (также известный как MIP-1a), CCL4 (также известный как MIP-1b), CCL5 (также известный как RANTES), CCL7 (также известный как MCP-3), CCL8 (также известный как MCP-2), CCL11 (также известный как эотаксин), CCL15 (также известный как MIP-1d), CCL17 (также известный как TARC), CCL19 (также известный как MIP-3b), CCL20 (также известный как MIP-3a), CCL21 (также известный как MIP-2), CCL24 (также известный как MPIF-2/эотаксин-2), CCL25 (также известный как TECK), CCL26 (также известный как эотаксин-3), CCR3, CCR4, CD3, CCR7, CD19, CD20, CD23 (также известный как FCER2, рецептор IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD47, CD48, CD70, CD80 (также известный как B7-1), CD86 (также известный как B7-2), CD122, CD137 (также известный как 41BB), CD137L, CD152 (также известный как CTLA4), CD154 (также известный как CD40L), CD160, CD272, CD273 (также известный как PDL2), CD274 (также известный как PDL1), CD275 (также известный как B7H2), CD276 (также известный как B7H3), CD278 (также известный как ICOS), CD279 (также известный как PD-1), CDH1 (также известный как E-кадгерин), хитиназа, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (также известный как M-CSF), CSF-2 (также известный как GM-CSF), CSF-3 (также известный как GCSF), CX3CL1 (также известный как SCYD1), CXCL12 (также известный как SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, GPRC5D, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2R-бета, IL1, IL1RAP, IL1LIA, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, RAP, IL9R, IL10, rIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (также известный как рецептор IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (также известный как интегрин b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, лептин, LPFS2, MHC класса II, NCR3LG1, KG2D, NTPDаза-1, OX40, OX40L, PD-1H, рецептор тромбоцитов, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (также известный как рецептор IL33), STEAP2, Сук-киназа, TAC1, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNF α , TFRSF7, Tr55, TREM1, TSLP (также известный как корецептор IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM и XCR1 (также известный как GPR5/CCXCR1), XCL1 и XCL2. В некоторых вариантах осуществления один или более из вышеуказанных целевых антигенов представляют собой целевые антигены человека.

В любом из биспецифических связывающих белков, описанных выше, можно использовать любой линкер или комбинацию линкеров, описанных в настоящем документе.

В определенных конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержащий набор CDR, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 200; SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 201; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 202; SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 203; SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 206; SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 207; SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 209; SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 210; SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 211; SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 152, SEQ

ID NO: 212; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 213; SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 214; SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 216; SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 217; SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 219; SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 220; SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 221; 5 SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 222; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223; SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 224; SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 226; SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 227; SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 229; SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 231; SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 10 113, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 234; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 236; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 239; SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 240; SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 242; SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 243; SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 15 184, SEQ ID NO: 244; SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 246; SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 247; SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 249; SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 250. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержащий набор 20 CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241.

Белки, связывающие анти-CD47

25 Определенные аспекты настоящего описания относятся к связывающим белкам, содержащим антигенсвязывающий сайт, который связывает полипептид CD47 (например, полипептиды CD47 человека и яванского макака). В некоторых вариантах осуществления связывающие белки являются моноспецифическими и/или одновалентными, биспецифическими и/или бивалентными, триспецифическими и/или тривалентными либо мультиспецифическими и/или мультивалентными.

30 В настоящем документе описаны различные характеристики примеров моноспецифических, биспецифических или триспецифических связывающих белков. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагирует с CD47 человека (например, SEQ ID NO: 300 (изоформа ОА3-323 CD47 человека), SEQ ID NO: 301 (изоформа ОА3-293 CD47 человека), SEQ ID NO: 302 (изоформа ОА3-305 CD47 человека) и SEQ ID NO: 303 (изоформа ОА3-312 CD47 человека)) и CD47 яванского макака.

35 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок является бивалентным и/или биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок является мультивалентным, например, тривалентным или

тетравалентным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из антигенсвязывающих сайтов связывает полипептид CD47 (например, внеклеточный домен полипептидов CD47 человека и/или яванского макака).

В любом из биспецифических связывающих белков, описанных выше, целевым антигеном, отличным от CD47, может быть любой из следующих примеров целевых антигенов: A2AR, APRIL, АТРДаза, BAFF, BAFFR, BCMA, BIYS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (также известный как VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (также известный как MCP-1), CCL3 (также известный как MIP-1a), CCL4 (также известный как MIP-1b), CCL5 (также известный как RANTES), CCL7 (также известный как MCP-3), CCL8 (также известный как MCP-2), CCL11 (также известный как эотаксин), CCL15 (также известный как MIP-1d), CCL17 (также известный как TARC), CCL19 (также известный как MIP-3b), CCL20 (также известный как MIP-3a), CCL21 (также известный как MIP-2), CCL24 (также известный как MPIF-2/эотаксин-2), CCL25 (также известный как TECK), CCL26 (также известный как эотаксин-3), CCR3, CCR4, CD3, CCR7, CD19, CD20, CD23 (также известный как FCER2, рецептор IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD47, CD48, CD70, CD80 (также известный как B7-1), CD86 (также известный как B7-2), CD122, CD137 (также известный как 41BB), CD137L, CD152 (также известный как CTLA4), CD154 (также известный как CD40L), CD160, CD272, CD273 (также известный как PDL2), CD274 (также известный как PDL1), CD275 (также известный как B7H2), CD276 (также известный как B7H3), CD278 (также известный как ICOS), CD279 (также известный как PD-1), CDH1 (также известный как E-кадгерин), хитиназа, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (также известный как M-CSF), CSF-2 (также известный как GM-CSF), CSF-3 (также известный как GCSF), CX3CL1 (также известный как SCYD1), CXCL12 (также известный как SDF1), CXCL13, CXCR3, DNDR-1, эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, G1TR, GITRL, GM-CSF, GPRC5D, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNa, IgE, IGF1R, IL2R-бета, IL1, IL1RAP, IL1LIA, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, RAP, IL9R, IL10, IL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (также известный как рецептор IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (также известный как интегрин b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, лептин, LPFS2, MHC класса II, NCR3LG1, KG2D, NTPДаза-1, OX40, OX40L, PD-1H, рецептор тромбоцитов, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (также известный как рецептор IL33), STEAP2, Сук-киназа, TAC1, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TFRSF7, Tr55, TREM1, TSLP (также известный как корецептор IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM и XCR1 (также известный как GPR5/CCXCR1), XCL1 и XCL2. В некоторых вариантах осуществления один или более из вышеуказанных целевых антигенов представляют собой целевые антигены человека.

В определенных конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержащий набор CDR, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 191; SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 192; SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 193; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 194; SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 196; SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 197; SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 199; SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 200; SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 201. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим

изобретением содержит связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержащий набор CDR, включающий SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195.

Биспецифические белки анти-CD47 и анти-CD38

5 Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека.

В частности, по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 200; SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 201; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 202; SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 203; SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 204; SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 206; SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 209; SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 210; SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 211; SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 212; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 213; SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 214; SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 216; SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 217; SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 219; SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 220; SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 221; SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 222; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223; SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 224; SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 226; SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 227; SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 229; SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 230; SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 231; SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 234; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 236; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 239; SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 240; SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 242; SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 243; SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 244; SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 246; SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 247; SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 249; SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 250; и по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 191; SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 192; SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 193; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 194; SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 196; SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 197; SEQ ID

NO: 78, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 199; SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 200; SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 201.

5 Более конкретно, по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; и по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержит набор CDR, включающий SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195. Даже более конкретно, по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR, включающий SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; и по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195.

10 В примерах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, содержащим по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека. По меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, может содержать любое из набора CDR, описанного выше и в параграфе «Связывающие белки анти-CD47». По меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека, могут содержать любое из набора CDR, описанного выше и в параграфе «Связывающие белки анти-CD38».

20 В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются монопаратопными, то есть они связываются с одним и тем же эпитопом их целевого антигена. В других вариантах осуществления по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются бипаратопными, то есть они связываются с различными эпитопами их целевого антигена. В частности, антитело в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения содержит по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека: один проксимальный связывающий участок Fc, который связывается с первым эпитопом CD38 человека, и один дистальный связывающий участок Fc, который связывается со вторым эпитопом CD38 человека. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один из по меньшей мере двух связывающих участков, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 232; SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241. В более специфических вариантах осуществления по меньшей мере один из по меньшей мере двух связывающих участков, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; и по меньшей мере один из по меньшей мере двух связывающих участков, который связывается с CD38 человека, содержит набор CDR SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237. В предпочтительном варианте осуществления проксимальный связывающий участок Fc, который связывается с первым эпитопом CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ

ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; и дистальный связывающий участок Fc, который связывается со вторым эпитопом CD38 человека, содержит набор CDR SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237. В более предпочтительном варианте осуществления проксимальный связывающий участок Fc, который связывается с первым эпитопом CD38 человека, содержит набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; дистальный связывающий участок Fc, который связывается со вторым эпитопом CD38 человека, содержит набор CDR SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; кроме того, биспецифическое антитело, описанное выше, содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержащий набор CDR, включающий SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195. Предпочтительно биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержащий набор CDR, включающий SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237, по меньшей мере второй связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержащий набор CDR, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241; и по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержащий набор CDR, включающий SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело представляет собой полноразмерное антитело, причем по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, и/или по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, представляет собой область Fab. Термин «Fab» или «область Fab» или «домен Fab», используемый в настоящем документе, включает в себя полипептиды, которые содержат домены иммуноглобулина VH, CH1, VL и CL. Fab может относиться к такой области в выделенном виде или к такой области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела. В настоящем изобретении также предложен фрагмент антитела, который связывается с CD38 человека или с CD47 человека. Фрагменты антитела включают, без ограничений, (i) Fab-фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного антитела, (iv) фрагмент dAb (Ward ES et al., (1989) *Nature*, 341: 544–546), который состоит из одного переменного участка, (v) фрагменты F(ab')₂, бивалентные фрагменты, содержащие два связанных Fab-фрагмента, (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), причем домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет двум доменам ассоциироваться для образования антигенсвязывающего сайта (Bird RE et al., (1988) *Science* 242: 423–426; Huston JS et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879–83), (vii) биспецифические одноцепочечные димеры Fv (PCT/US92/09965), (viii) «диатела» или «триатела», мультивалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированные путем слияния генов (Tomlinson I & Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461–79; WO94/13804; Holliger P et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444–48), и (ix) scFv, генетически слитый с тем же или другим антителом (Coloma MJ & Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159–163).

В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека и представляет собой Fab, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 299; в конкретном варианте осуществления Fab, который связывается с CD47 человека, содержит цепь VH с мутацией G65S (нумерация по Кабату), в более конкретных вариантах осуществления Fab, который связывается с CD47 человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 299. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит по меньшей мере Fab, который связывается с CD47 человека, имеющий SEQ ID NO: 15 и содержащий цепь VH с мутацией G65S (нумерация по Кабату), в частности, биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит по меньшей мере Fab, который связывается с CD47 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 299. В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека и представляет собой Fab, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70. Предпочтительно аминокислотная последовательность Fab, который связывается с CD38 человека, выбирается из группы, включающей SEQ ID NO: 43, 52, 55, 57 и 61.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело конструируют с использованием технологии гетеродимеризации тяжелой цепи (Hc) BEAT®, описанной ранее (Skegto et al., (2017) J Biol Chem 292(23): 9745–9759 и Stutz et al., (2020) J Biol Chem 295(28): 9392–9408, WO2012131555), причем цепь BEAT(A) также упоминается в настоящем документе как BEAT(A) и цепь BEAT(B) также упоминается в настоящем документе как BEAT(B). Более конкретно, Hc BEAT(A) включает в себя домен VH с мутацией G65S (нумерация по Кабату), область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 и основанный на γ 3 домен CH3 BEAT(A), собранный с общей легкой цепью (cLc). Hc BEAT(B) включает в себя домен VH, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 и основанный на γ 1 домен CH3 BEAT(B), собранный с cLc. В соответствии с настоящим изобретением тяжелая цепь (Hc) BEAT(A) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 259, 274, 276, 280, 281, 283, 285 и 278; Hc BEAT(B) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 260, 261, 262, 275, 277, 279, 282, 284, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292 и 293. cLc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В предпочтительных вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 284, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 285, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 287, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или цепь BEAT(A), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, цепь BEAT(B), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 293, и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В предпочтительных вариантах осуществления биспецифическое антитело, раскрываемое в настоящем документе, содержит цепь BEAT(A), которая связывается с CD47 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280; цепь BEAT(B), которая связывается с CD38 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292 или 293, более предпочтительно аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 293; и cLc, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

30 В определенных аспектах в настоящем изобретении раскрывается биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека, причем по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, обладает аффинностью к CD47 человека меньше аффинности по меньшей мере одного связывающего участка, который связывается с CD38 человека, к CD38 человека. В частности, по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, обладает аффинностью к CD47 человека, составляющей приблизительно 1000 нМ или менее, или приблизительно 900 нМ или менее, или приблизительно 800 нМ или менее, или приблизительно 850 нМ или менее, или приблизительно 700 нМ или менее, или приблизительно 600 нМ или менее,

или приблизительно 500 нМ или менее, или приблизительно 400 нМ или менее, или приблизительно 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, или приблизительно 150 нМ или менее, или приблизительно 140 или менее, или приблизительно 130 нМ или менее, или приблизительно 120 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 110 нМ или менее, более предпочтительно 105 нМ или менее, например, приблизительно 104 нМ; или предпочтительно от приблизительно 700 нМ до приблизительно 1000 нМ, более предпочтительно от приблизительно 798 нМ до приблизительно 958 нМ, более предпочтительно приблизительно 878,3 нМ. В частности, по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, обладает аффинностью к CD38 человека, составляющей приблизительно 100 нМ или менее, или приблизительно 50 нМ или менее, или приблизительно 30 или менее, или приблизительно 20 или менее, или приблизительно 10 или менее, предпочтительно приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 9 нМ или менее, приблизительно 8 нМ или менее, приблизительно 7 нМ или менее, приблизительно 6 нМ или менее, приблизительно 5 нМ или менее, приблизительно 4 нМ или менее, приблизительно 3 нМ или менее, приблизительно 2 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 1 нМ или менее, например, приблизительно 16,22 нМ, приблизительно 17,6 нМ, приблизительно 6,13 нМ, приблизительно 2,3 нМ, приблизительно 3,5 нМ, приблизительно 0,55 нМ, приблизительно 0,9 нМ.

В настоящем изобретении также раскрываются биспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека, в частности, бипаратопные биспецифические антитела, причем аффинность проксимального связывающего участка Fc к первому эпитопу CD38 человека является приблизительно равной или равной либо отличной от аффинности дистального связывающего участка Fc ко второму эпитопу CD38 человека.

20 Нуклеиновые кислоты

Стандартные методики получения рекомбинантной ДНК используют для конструирования полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды, образующие связывающие белки, включения таких полинуклеотидов в рекомбинантные векторы экспрессии и введения таких векторов в клетки-хозяева. См., например, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed.). Ферментативные реакции и методики очистки могут применяться в соответствии со спецификациями изготовителя, в соответствии с практиками, являющимися стандартными для данной области, или в соответствии с описанием, представленным в настоящем документе. При отсутствии конкретных определений номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, а также эти лабораторные процедуры и методики, описанные в настоящем документе, хорошо известны и повсеместно применяются в данной области. Аналогичным образом для химических синтезов, химических анализов, приготовления фармацевтических препаратов, составов, доставки и лечения пациентов можно использовать традиционные методики.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из связывающих белков, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат последовательность,

которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, 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% или на 100% идентична.

- 5 Определенные аспекты настоящего описания относятся к наборам полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов представляет собой вектор (например, экспрессионный вектор). Наборы могут найти применение, помимо прочего, для приготовления одного или более связывающих белков, описанных в настоящем документе, например, би- или триспецифического связывающего белка настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один, два, три или четыре полинуклеотида.
- 10 В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота функционально связана с гетерологичным промотором для прямой транскрипции нуклеотидной последовательности, кодирующей связывающий белок. Промотор может относиться к контрольным нуклеотидным последовательностям, которые управляют транскрипцией нуклеиновой кислоты. Первая нуклеотидная последовательность функционально связана со второй нуклеотидной последовательностью, если первая нуклеотидная последовательность находится в функциональной взаимосвязи со
- 15 второй нуклеотидной последовательностью. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью связывающего белка, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Примеры промоторов могут включать, без ограничений, промоторы, полученные из геномов вирусов (таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В, вирус обезьян 40 (SV40) и т. п.),
- 20 из гетерологичных эукариотических промоторов (таких как промотор актина, промотор иммуноглобулина, промотор теплового шока и т. п.), CAG-промотор (Niwa et al., *Gene* 108(2): 193–9, 1991), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), тетрациклин-индуцируемый промотор (Masui et al., *Nucleic Acids Res.* 33: e43, 2005), система lac, система tip, система tac, система trc, главные операторные и промоторные области фага лямбда, промотор 3-фосфоглицераткиназы, промоторы кислой фосфатазы дрожжей и промотор факторов альфа-скреивания дрожжей. Полинуклеотиды,
- 25 кодирующие связывающие белки настоящего описания, могут контролироваться конститутивным промотором, индуцируемым промотором или любым другим подходящим промотором, описанным в настоящем документе, либо другим подходящим промотором, который будет с легкостью определен специалистом в данной области.

- В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота встроена в вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой экспрессионный вектор. Экспрессионные векторы могут включать в себя
- 30 одну или более регуляторных последовательностей, функционально связанных с экспрессируемым полинуклеотидом. Термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Примеры подходящих энхансеров могут включать, без ограничений, энхансерные последовательности из генов млекопитающих (такие как глобин, эластаза, альбумин, а-фетопротейн, инсулин и т. п.) и энхансерные последовательности из вируса эукариотической клетки (такие как энхансер SV40 на
- 35 участке позднего начала репликации (100–270 п. о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер

полиомы на участке позднего начала репликации, энхансеры аденовируса и т. п.). Примеры подходящих векторов могут включать, в частности, плазмиды, космиды, эписомы, транспозоны и вирусные векторы (например, аденовирусные, вируса осповакцины, вируса Синдбис, вируса кори, вируса герпеса, лентивирусные, ретровирусные, аденоассоциированные вирусные векторы и т. д.). Экспрессионные векторы могут использоваться для трансфекции

5 клеток-хозяев, таких как, например, бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих.

Биологически функциональные векторы вирусных и плазмидных ДНК, способные осуществлять экспрессию и репликацию в клетке-хозяине, известны в данной области и могут использоваться для трансфекции любой клетки, представляющей интерес.

10 Другие аспекты настоящего описания относятся к векторной системе, содержащей один или более векторов, кодирующих первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь любого из связывающих белков, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит первый вектор, кодирующий первую полипептидную цепь связывающего белка, второй вектор, кодирующий вторую полипептидную

15 цепь связывающего белка, третий вектор, кодирующий третью полипептидную цепь связывающего белка, и четвертый вектор, кодирующий четвертую полипептидную цепь связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит первый вектор, кодирующий первую и вторую полипептидные цепи связывающего белка, и второй вектор, кодирующий третью и четвертую полипептидные цепи связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит первый вектор, кодирующий первую и третью полипептидные цепи связывающего белка, и второй вектор, кодирующий вторую и четвертую полипептидные цепи связывающего белка. В

20 некоторых вариантах осуществления векторная система содержит первый вектор, кодирующий первую и четвертую полипептидные цепи связывающего белка, и второй вектор, кодирующий вторую и третью полипептидные цепи связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит первый вектор, кодирующий первую, вторую, третью и четвертую полипептидные цепи связывающего белка. Один или более векторов векторной системы могут представлять собой любой из векторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах

25 осуществления один или более векторов представляют собой экспрессионные векторы.

Выделенные клетки-хозяева

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенной клетке-хозяину, содержащей один или более выделенных полинуклеотидов, наборов полинуклеотидов, векторов и/или векторных систем, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку

30 (например, клетку *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку (например, клетку *S. cerevisiae*). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого. Примеры клеток-хозяев насекомых могут включать, в частности, клетки *Drosophila* (например, клетки S2), клетки *Trichoplusia ni* (например, клетки High Five™) и клетки *Spodoptera frugiperda* (например, клетки Sf21 или Sf9). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

35 Примеры клеток-хозяев млекопитающих могут включать, в частности, могут относиться человеческие эмбриональные

- клетки почки (например, клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре), клетки Expi293TM, клетки CHO, клетки почки новорожденного хомяка (например, ВНК, ATCC CCL 10), мышинные клетки Сертоли (например, клетки TM4), клетки почки обезьяны (например, CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой обезьяны (например, VERO-76, ATCC CRL-1587), человеческие клетки карциномы шейки матки (например, HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (например, MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени крысы линии Buffalo (например, BRL 3A, ATCC CRL 1442), человеческие клетки легкого (например, W138, ATCC CCL 75), человеческие клетки печени (например, Hep G2, HB 8065), мышинные клетки опухоли молочной железы (например, ММТ 060562, ATCC CCL 51), клетки TRI, клетки MRC 5, клетки FS4, человеческие клетки линии гепатомы (например, Hep G2) и клетки миеломы (например, клетки NS0 и Sp2/0).
- 10 Другие аспекты настоящего описания относятся к методу продукции любого из связывающих белков, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления метод включает а) культивирование клетки-хозяина (например, любой из клеток-хозяев, описанных в настоящем документе), содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, вектор и/или векторную систему (например, любую из выделенных нуклеиновых кислот, векторов и/или векторных систем, описанных в настоящем документе), в условиях, при которых клетка-хозяин экспрессирует
- 15 связывающий белок; и b) выделение связывающего белка из клетки-хозяина. Методы культивирования клеток-хозяев в условиях, при которых происходит экспрессия белка, хорошо известны рядовым специалистам в данной области. Методы выделения белков из культивированных клеток-хозяев хорошо известны рядовым специалистам в данной области, в том числе, например, аффинная хроматография (например, двухступенчатая аффинная хроматография, включающая аффинную хроматографию с белком А с последующей гель-фильтрацией).
- 20 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания очищают с помощью аффинной хроматографии с белком А.

Линкеры

- В некоторых вариантах осуществления длина линкеров L1, L2, L3 и L4 варьируется в диапазоне от полного отсутствия аминокислот (длина = 0) до приблизительно 100 аминокислот или менее 100, 50, 40, 30, 20 или 15 аминокислот или
- 25 менее. Длина линкеров также может составлять 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту. Все L1, L2, L3 и L4 в одном связывающем белке могут иметь одну и ту же аминокислотную последовательность или разные аминокислотные последовательности.

- Примеры приемлемых линкеров включают единичный остаток глицина (Gly); дипептид (Gly-Gly); трипептид (Gly-Gly-Gly); пептид с четырьмя остатками глицина; пептид с пятью остатками глицина; пептид с шестью
- 30 остатками глицина; пептид с семью остатками глицина; и пептид с восемью остатками глицина. Могут использоваться другие комбинации аминокислотных остатков, такие как пептид GGGT (SEQ ID NO: 297), или GGGGS, или повторения указанных пептидов, такие как пептид GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 298). В предпочтительном варианте осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 298.

Примеры, перечисленные выше, не призваны каким-либо образом ограничивать объем настоящего описания, и было показано, что линкеры, содержащие случайно выбранные аминокислоты, выбранные из группы, включающей валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарат, глутамат, аспарагин, глутамин, глицин и пролин, являются приемлемыми для использования в связывающих белках. Дополнительные описания линкерных последовательностей приводятся, например, в WO2012135345 и международной заявке № PCT/US2017/027488.

Идентичность и последовательность аминокислотных остатков в линкере могут варьироваться в зависимости от типа вторичного структурного элемента, который необходимо получить в линкере. Например, глицин, серин и аланин лучше всего подходят для линкеров с максимальной гибкостью. Некоторые комбинации глицина, пролина, треонина и серина полезны в том случае, если требуется более жесткий и протяженный линкер. Любой аминокислотный остаток можно рассматривать как линкер в комбинации с другими аминокислотными остатками для конструирования более длинных пептидных линкеров при необходимости в зависимости от желаемых свойств.

Области Fc и константные домены

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему область Fc. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит фрагмент антитела, включая, без ограничений, фрагменты антитела F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv или scFv. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит фрагмент антитела, включая, без ограничений, фрагменты антитела F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv или scFv, содержащие область Fc.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит тяжелую цепь полноразмерного антитела или полипептидную цепь, содержащую область Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человека, например, область Fc человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления область Fc включает в себя шарнир антитела, домены CH1, CH2, CH3 и необязательно домен CH4. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления область Fc включает одну или более мутаций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания включает один или два варианта Fc. Термин «вариант Fc», используемый в настоящем документе, относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована из нативной Fc, но по-прежнему содержит сайт связывания для резервного рецептора FcRn (неонатального рецептора Fc). Примеры вариантов Fc и их взаимодействие с резервным рецептором известны специалистам в данной области. Таким образом, термин «вариант Fc» может включать в себя молекулу или последовательность, которая гуманизирована из нативной Fc, не относящейся к человеку. Кроме того, нативная Fc содержит области, которые могут быть удалены, поскольку они обеспечивают структурные свойства или биологическую активность, которые не требуются для антителоподобных связывающих белков настоящего изобретения. Таким образом, термин «вариант Fc» включает в себя молекулу или последовательность, в которой

отсутствует один или более из нативных сайтов или остатков Fc либо в которой модифицирован один или более из сайтов или остатков Fc, влияющих на или участвующих в: (1) формировании дисульфидной связи, (2) несовместимости с выбранной клеткой-хозяином, (3) N-концевой гетерогенности при экспрессии в выбранную клетку-хозяина, (4) гликозилировании, (5) взаимодействии с комплементом, (6) связывании с рецептором Fc, отличным от резервного рецептора, или (7) антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Термин «родительское антитело» или «родительский иммуноглобулин», используемый в настоящем документе, включает в себя немодифицированное антитело, которое впоследствии модифицируется для получения варианта. Указанное родительское антитело может представлять собой антитело природного происхождения, антитело неприродного происхождения либо вариант или сконструированную версию антитела природного происхождения. Родительским антителом может называться собственно антитело, композиции, которые содержат родительское антитело, или аминокислотная последовательность, которая его кодирует. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения родительское антитело содержит область Fc. Более конкретно, область Fc родительского антитела в соответствии с настоящим изобретением представляет собой область Fc человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; в некоторых вариантах осуществления область Fc родительского антитела в соответствии с настоящим изобретением представляет собой модифицированную или немодифицированную область Fc IgG1.

В определенных аспектах биспецифическое антитело настоящего изобретения содержит вариантную область Fc, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно области Fc родительского антитела, при этом антитело, содержащее вариантную область Fc, демонстрирует измененную эффекторную функцию по сравнению с родительским антителом. Более конкретно, домен CH2 области Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело конструируют с использованием технологии гетеродимеризации тяжелой цепи (Hc) BEAT®, описанной ранее (Skegro *et al.*, (2017) J Biol Chem 292(23): 9745–9759 и Stutz *et al.*, (2020) J Biol Chem 295(28): 9392–9408, WO2012131555), причем цепь BEAT(A), которая также упоминается в настоящем документе как BEAT(A), и цепь BEAT(B), которая также упоминается в настоящем документе как BEAT(B), сконструированы таким образом, чтобы усилить эффекторную функцию Fc. Более конкретно, домен CH2 области Fc сконструирован таким образом, чтобы он содержал по меньшей мере одну аминокислотную модификацию. Более конкретно, BEAT(A) содержит одну или более замен в положении, выбранном из группы, включающей: 324, 334, 269, 298, 239, 332 и 333; и BEAT(B) содержит одну или более замен в положении, выбранном из группы, включающей: 324, 334, 269, 298, 239, 332 и 333; предпочтительно включающей 324, 334, 269, 289, 298, 333. Еще более конкретно, BEAT(A) содержит одну или более замен в положении, выбранном из группы, включающей: S324N, K334E, K334A, E269D, S298A, S239D, I332E и E333A; и BEAT(B) содержит одну или более замен в положении, выбранном из группы, включающей: S324N, K334E, K334A, E269D, S289A, K334A, E333A. В определенных конкретных вариантах осуществления BEAT(B) содержит набор мутаций, выбранных из группы, включающей: S324N; или S324N и K334E; или E269D, S298A, S324N и K334A; или S239D, I332E и S324N; или E269D, S298A, S324N и E333A; или S298A, S324N и E333A; или S298A, S324N и K334A; или S324N, S298A, E269D и E333A;

или S324N, S298A, E269D и K334A. В других конкретных вариантах осуществления BEAT(B) содержит набор мутаций, выбранных из группы, включающей: S324N; или S324N и K334E; или E269D, S298A, S324N и K334A; или S239D, I332E и S324N; или E269D; или E269D, S298A, S324N и E334A; или S298A, S324N и E333A; или S298A, S324N и K334A; или S324N, S298A, E269D и E333A; или S324N, S298A, E269D и K334A. В определенных предпочтительных вариантах осуществления BEAT(A) и BEAT(B) содержит мутацию S324N; или мутации S324N и K334E; или мутации E269D, S298A, S324N и K334A; или мутации E269D, S298A, S324N и E334A; или мутации S298A, S324N и E333A; или мутации S298A, S324N и K334A; или мутации S324N и K334E. В особенно предпочтительных вариантах осуществления BEAT(A) содержит мутации S239D, I332E и S324N и BEAT(B) содержит мутацию S324N.

В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более мутаций, которые уменьшают или исключают связывание с рецептором Fc и/или эффекторную функцию области Fc (например, опосредованный рецептором Fc антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC)).

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG1, содержащую одну или более аминокислотных замен в положениях, соответствующих положениям 234, 235 и/или 329 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой L234A, L235A и/или P329A. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG1, содержащую аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 298, 299 и/или 300 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой S298N, T299A и/или Y300S.

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую одну или более мутаций, которые уменьшают или исключают связывание Fc γ 1 и/или Fc γ II. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую одну или более мутаций, которые уменьшают или исключают связывание Fc γ 1 и/или Fc γ II, но не влияют на связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 228 и/или 409 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой S228P и/или R409K. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 234 и/или 235 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой F234A и/или L235A.

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 228, 234, 235 и/или 409 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой S228P, F234A, L235A и/или R409K. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 233–236 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены

представляют собой E233P, F234V, L235A и делецию в 236. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG4, содержащую аминокислотные мутации в заменах, соответствующих положениям 228, 233–236 и/или 409 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные мутации представляют собой S228P; E233P, F234V, L235A и делецию в 236; и/или R409K.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит одну или более мутаций для улучшения очистки, например, за счет модулирования аффинности к реагенту для очистки. Например, известно, что гетеродимерные связывающие белки можно селективно очистить от их гомодимерных форм, если одна из двух областей Fc гетеродимерной формы содержит мутацию (-и), которая (-ые) уменьшает (-ют) или исключает (-ют) связывание с белком А, поскольку гетеродимерная форма будет обладать промежуточной аффинностью к очистке на основе белка А по сравнению с любой гомодимерной формой и может быть селективно элюирована из белка А, например, посредством использования другого рН (см., например, Smith, E.J. et al. (2015) Sci. Rep. 5: 17943). В некоторых вариантах осуществления мутация содержит замены в положениях, соответствующих положениям 435 и 436 человеческого IgG1 или IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой H435R и Y436F. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит вторую полипептидную цепь, дополнительно содержащую первую область Fc, связанную с CH1, причем первая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3, и третью полипептидную цепь, дополнительно содержащую вторую область Fc, связанную с CH1, причем вторая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3; и при этом только одна из первой и второй областей Fc содержит аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 435 и 436 человеческого IgG1 или IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой H435R и Y436F. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит мутации выступа и впадины и одну или более мутаций для улучшения очистки. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG4.

Для улучшения выхода некоторых связывающих белков (например, биспецифических или триспецифических связывающих белков) домены CH могут быть изменены с помощью технологии BEAT, подробно описанной с несколькими примерами в и в международной публикации № WO2012131555.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит одну или более мутаций для увеличения периода полувыведения из сыворотки (см., например, Hinton, P R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346–56). В некоторых вариантах осуществления мутация содержит замены в положениях, соответствующих положениям 428 и 434 человеческого IgG1 или IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой M428L и N434S. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит вторую полипептидную цепь, дополнительно содержащую первую область Fc, связанную с CH1, причем первая область Fc содержит шарнирную

область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3, и третью полипептидную цепь, дополнительно содержащую вторую область Fc, связанную с CH1, причем вторая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3, при этом первая и/или вторая области Fc содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих 5 положениям 428 и 434 человеческого IgG1 или IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой M428L и N434S. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит мутации выступа и впадины и одну или более мутаций для увеличения периода полувыведения из сыворотки. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc 10 человеческого IgG4.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит одну или более мутаций для снижения эффекторной функции, например, опосредованного рецептором Fc антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и/или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь дополнительно 15 содержит первую область Fc, связанную с CH1, причем первая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3; при этом третья полипептидная цепь дополнительно содержит вторую область Fc, связанную с CH1, причем вторая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3; при этом первая и вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG1; и при этом первая и вторая области Fc в каждом 20 случае содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 234 и 235 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой L234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления области Fc второй и третьей полипептидных цепей представляют собой области Fc человеческого IgG1, и при этом области Fc в каждом случае содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих 25 положениями 234 и 235 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой L234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь дополнительно содержит первую область Fc, связанную с CH1, причем первая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3; при этом третья полипептидная цепь дополнительно содержит вторую область Fc, связанную с CH1, причем вторая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина CH2 и CH3; при этом первая и вторая 30 области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG1; и при этом первая и вторая области Fc в каждом случае содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 234, 235 и 329 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой L234A, L235A и P329A. В некоторых вариантах осуществления области Fc второй и третьей полипептидных цепей представляют собой области Fc человеческого IgG1, и при этом области Fc в каждом случае содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих 35 соответствующим положениям 234, 235 и 329 человеческого IgG1 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой L234A, L235A и P329A. В некоторых вариантах осуществления области Fc второй и третьей полипептидных цепей представляют собой области Fc человеческого IgG4, и области Fc в каждом случае

- содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениями 234 и 235 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой F234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит вторую полипептидную цепь, дополнительно содержащую первую область Fc, связанную с СН1, причем первая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина СН2 и СН3, и третью полипептидную цепь, дополнительно содержащую вторую область Fc, связанную с СН1, причем вторая область Fc содержит шарнирную область иммуноглобулина и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина СН2 и СН3. и при этом первая и вторая области Fc в каждом случае содержат аминокислотные замены в положениях, соответствующих положениям 234 и 235 человеческого IgG4 согласно индексу ЕС, причем аминокислотные замены представляют собой F234A и L235A.
- 5
- 10 В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания содержит мутации выступа и впадины и одну или более мутаций для снижения эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая области Fc представляют собой области Fc человеческого IgG4. Дополнительное описание мутаций Fc в положении 329 см., например, в работе Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591–6604 и
- 15 WO 1999051642.

Применение связывающего белка

- Связывающие белки можно использовать в любом известном методе анализа, таком как конкурентно-связывающие анализы, прямые и непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации, для обнаружения и количественного определения одного или более целевых антигенов. Связывающие белки будут связываться с одним или более целевыми антигенами с аффинностью, которая является надлежащей для используемого метода анализа.
- 20

- Для диагностических сфер применения в определенных вариантах осуществления связывающие белки могут быть помечены пригодным для обнаружения фрагментом. Пригодным для обнаружения фрагментом может быть любой фрагмент, способный напрямую или опосредованно продуцировать детектируемый сигнал. Например, пригодным для обнаружения фрагментом может быть радиоизотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²⁵I, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In или ⁶⁷Ga; флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза или пероксидаза хрена.
- 25

- Связывающие белки также могут использоваться для визуализации *in vivo*. Связывающий белок, помеченный пригодным для обнаружения фрагментом, можно вводить животному, предпочтительно в кровоток, и анализировать наличие и локализацию помеченного антитела в организме-хозяине. Связывающий белок может быть помечен любым фрагментом, который пригоден для обнаружения у животного с помощью ядерного магнитного резонанса, радиологии или других средств детектирования, известных специалистам в данной области.
- 30

Для клинического или исследовательского применения в определенных вариантах осуществления связывающие белки могут быть конъюгированы с цитотоксическим агентом. Для таргетирования цитотоксических нагрузок для

специфических опухолевых клеток использовали различные антитела, связанные с цитотоксическими агентами (т. е. конъюгаты антитело-лекарственное средство). Цитотоксические агенты и линкеры, которые конъюгируют агенты с антителом, известны специалистам в данной области; см., например, Parslow, A.C. et al. (2016) *Biomedicines* 4: 14 и Kalim, M. et al. (2017) *Drug Des. Devel. Ther.* 11:2265–2276.

5 Описание также относится к набору, содержащему связывающий белок и другие реагенты, приемлемые для
 детектирования уровней целевого антигена в биологических образцах. Такие реагенты могут включать пригодную для
 обнаружения метку, блокирующую сыворотку, образцы положительного и отрицательного контроля и реагенты
 10 детектирования. В некоторых вариантах осуществления набор содержит композицию, содержащую любой
 связывающий белок, полинуклеотид, вектор, векторную систему и/или клетку-хозяина, описанные в настоящем
 документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш на
 контейнере или в связи с ним. Приемлемые контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для
 растворов для внутривенного введения и т. д. Контейнеры могут быть образованы из различных материалов, таких как
 15 стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией
 является эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики того или иного состояния, и может иметь
 отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для раствора для
 внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, выполненную с возможностью прокалывания иглой для
 подкожных инъекций). В некоторых вариантах осуществления на этикетке или в листке-вкладыше указывается, что
 20 композиция используется для предотвращения, диагностики и/или лечения выбранного состояния. Альтернативно или
 дополнительно изделие или набор могут дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий
 фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой
 буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с
 коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания вводят нуждающемуся в этом
 пациенту для лечения или предотвращения рака. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание
 25 относится к методу предотвращения и/или лечения пролиферативного заболевания или расстройства (например, рака).
 В некоторых вариантах осуществления метод предусматривает введение пациенту терапевтически эффективного
 количества гетеродимерного антитела или связанных с ним фармацевтических композиций, описанных в настоящем
 документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к применению гетеродимерного
 антитела или связанных с ним фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, для
 30 предотвращения и/или лечения пролиферативного заболевания или расстройства (например, рака) у нуждающегося в
 этом пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к гетеродимерному антителу
 или связанным с ним фармацевтическими композициям, описанным в настоящем документе, для использования при
 изготовлении лекарственного средства для предотвращения и/или лечения пролиферативного заболевания или
 расстройства (например, рака) у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент
 35 представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит один
 антигенсвязывающий сайт, который связывается с поверхностным белком Т-клетки, и другой антигенсвязывающий

сайт, который связывается с внеклеточным доменом полипептида CD38 человека. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит антигенсвязывающий сайт, который связывается с внеклеточным доменом полипептида CD38 человека, и антигенсвязывающий сайт, который связывается с полипептидом CD47 человека.

- 5 В некоторых вариантах осуществления клетки рака экспрессируют полипептид CD38 1 человека на своей клеточной поверхности (например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клетки рака экспрессируют изоформу CD38 человека SEQ ID NO: 295 (изоформа 28907-1 CD38 человека), SEQ ID NO: 294 (изоформа 38907-2 CD38 человека), SEQ ID NO: 296 (изоформа 28907-E CD38 человека). В некоторых вариантах осуществления пациента выбирают для лечения исходя из того, что клетки рака экспрессируют
- 10 изоформу CD38 человека SEQ ID NO: 295 (изоформа 28907-1 CD38 человека), SEQ ID NO: 294 (изоформа 28907-2 CD38 человека), SEQ ID NO: 296 (изоформа 28907-E CD38 человека).

- В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, включающей: для применения при лечении множественной миеломы, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, рака молочной железы, такого как Her2-положительный рак молочной железы, рака предстательной железы, рака шейки матки, лимфомы В-клеток герминативного центра или В-клеточного острого
- 15 лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), высокозлокачественной серозной карциномы яичников, перитонеального рака.
- В конкретном варианте осуществления рак представляет собой множественную миелому. Антитела к CD38, такие как даратумумаб, также называемый в настоящем документе Darzalex®, и изатуксимаб, исследовали для лечения множественной миеломы. Тем не менее несмотря на то, что множественная миелома считается поддающейся лечению, почти у всех пациентов неизбежен рецидив, приводящий к развитию рефрактерного к лечению заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления пациент получал предшествующее лечение по поводу множественной
- 20 миеломы. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок настоящего описания вводят пациенту в рамках 1-й, 2-й или 3-й линии лечения по поводу множественной миеломы.

- В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое имеет по меньшей мере один связывающий участок, связывающийся с CD47, позволяет блокировать взаимодействие между CD47 и SIRP α , избегая передачи сигнала «не ешь меня» вследствие взаимодействия CD47-SIRP α , который ингибирует фагоцитоз макрофагов. Примером клинического эталонного моноклонального антитела, которое связывается с CD47, является магролимаб, также называемый в настоящем документе 5F9. В настоящем изобретении термины «магролимаб» и «5F9» используются взаимозаменяемо. В определенных вариантах осуществления исследованная молекула представляет собой «59F-подобное» (также называемое в настоящем документе «магролимаб-подобным») антитело, которое является идентичным молекуле клинического магролимаба, но
- 30 получено в рамках собственной разработки. В настоящем изобретении термины «магролимаб», «5F9», «59F-

подобный» и «маглолимаб-подобный» являются взаимозаменяемыми. Более конкретно, биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека, блокирует взаимодействие CD47-SIRP α и, следовательно, селективным образом сигнал «не ешь меня» в клетках, экспрессирующих CD38.

- 5 В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует более высокий уровень связывания с линиями опухолевых клеток CD38 high (такими как Daudi, Raji, KMS-12-PE) по сравнению с эталонными Darzalex и 5F9 *in vitro*. В других вариантах осуществления биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует более высокий уровень связывания с линиями опухолевых клеток CD38 low (NCI-H929 и KMS-12-BM) по сравнению с Darzalex. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют эффективность, сравнимую с таковой у 5F9, при индуцировании фагоцитоза в опухолевых клетках, экспрессирующих оба из CD38^{high} или CD38^{low}, *in vitro*. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют более высокий уровень уничтожения опухолевых клеток посредством CDC по сравнению с Darzalex *in vitro*. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют уровень уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{high} или CD38^{low}, посредством ADCC, сравнимый с уровнем, индуцированным Darzalex, и более высокую активность в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, *in vitro*. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют более высокую активность по сравнению с комбинацией Darzalex и 5F9 *in vitro*.

20 Терапевтические композиции связывающего белка и их введение

Терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие связывающие белки, входят в объем настоящего описания. Такие терапевтические или фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество связывающего белка или конъюгата связывающий белок-лекарственное средство с добавкой фармацевтически или физиологически приемлемого агента для приготовления состава, выбранного для соответствия способу введения. Приемлемые материалы для приготовления состава предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

Фармацевтическая композиция может включать в себя материалы для приготовления состава для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции.

- 30 Приемлемые материалы для приготовления состава включают, без ограничений, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), противомикробные средства, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия), буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты), объемобразующие агенты (такие как маннит или глицин), хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)), комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин), наполнители, моносахариды,
- 35

дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины), красители, вкусоароматические агенты и разбавители, эмульгирующие агенты, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон), низкомолекулярные полипептиды, солеобразующие противоионы (такие как натрий), консерванты (такие как бензалконийхлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода), растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль), сахарные спирты (такие как маннит или сорбит), суспендирующие агенты, поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как pluronic; PEG; сложные эфиры сорбитана; полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80; Triton; трометамин; лецитин; холестерин или тилоксапол), агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит), агенты, повышающие тоничность (такие как галиды щелочных металлов — предпочтительно хлорид натрия или калия — или маннит, сорбит), несущие среды для доставки, разбавители, эксципиенты и/или фармацевтические вспомогательные вещества (см., например, работу REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990) и последующие ее издания, включенные в настоящий документ для любой цели путем ссылки).

15 Оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области в зависимости от, например, предусмотренного способа введения, формата доставки и желаемой дозировки. Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса связывающего белка *in vivo*.

20 Первичная несущая среда или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, приемлемой несущей средой или носителем для инъекции может быть вода, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, с добавлением других материалов, повсеместно применяемых в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными примерами несущих сред.

25 Другие примеры фармацевтических композиций включают Tris-буфер с приблизительным pH 7,0–8,5 или ацетатный буфер с приблизительным pH 4,0–5,5, который может дополнительно включать сорбит или приемлемую замену. В одном варианте осуществления настоящего описания композиции связывающего белка могут быть подготовлены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты, с необязательными агентами для приготовления состава в форме лиофилизированной массы или водного раствора. Дополнительно связывающий белок может быть приготовлен в форме лиофилизата с использованием надлежащих эксципиентов, таких как сахароза.

35 Фармацевтические композиции настоящего описания могут быть выбраны для парентеральной или подкожной доставки. Альтернативно композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций известно специалистам в данной области.

Компоненты состава представлены в концентрациях, являющихся приемлемыми для места введения. Например, буферы используют для поддержания композиции на уровне физиологического рН или немного более низкого рН, как правило, в диапазоне рН от приблизительно 5 до приблизительно 8.

5 Если рассматривается возможность парентерального введения, терапевтические композиции для применения могут быть в форме апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемый связывающий белок в фармацевтически приемлемой несущей среде. Особенно приемлемой несущей средой для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой связывающий белок приготовлен в форме надлежащим образом сохраненного стерильного изотонического раствора.

10 Еще один препарат может включать в себя состав желаемой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые обеспечивают контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который в таком случае может быть доставлен посредством инъекции замедленного всасывания. Также можно использовать гиалуроновую кислоту, и это может оказывать эффект способствования замедлению выведения из кровообращения. Другие приемлемые средства для введения желаемой молекулы включают имплантируемые устройства доставки
15 лекарственных средств.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть приготовлена в форме для ингаляции. Например, связывающий белок может быть приготовлен в форме сухого порошка для ингаляции. Ингаляционные растворы связывающего белка также могут быть приготовлены в форме с пропеллентом для аэрозольной доставки. В еще одном варианте осуществления растворы можно небулизировать.

20 Также предполагается, что определенные составы могут вводиться перорально. В одном варианте осуществления настоящего описания связывающие белки, которые вводят таким образом, могут быть приготовлены в форме с добавлением или без добавления тех носителей, которые обычно применяют для приготовления твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, можно разработать капсулу для высвобождения активной части состава в такой точке желудочно-кишечного тракта, где будет достигнута максимальная
25 биодоступность и минимальная досистемная деградация. Для улучшения адсорбции связывающего белка можно включать дополнительные агенты. Также можно использовать разбавители, вкусоароматические добавки, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связующие вещества.

30 Другая фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество связывающих белков в смеси с нетоксичными эксципиентами, которые приемлемы для производства таблеток. Посредством растворения таблеток в стерильной воде или другой надлежащей несущей среде можно готовить растворы в однократной форме. Приемлемые эксципиенты включают, без ограничений, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связывающие агенты, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции описания будут очевидны специалистам в данной области, включая составы, содержащие связывающие белки в составах с замедленной или контролируемой доставкой. Методики приготовления множества других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекции замедленного всасывания, также известны специалистам в данной области. Дополнительные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), этиленвинилацетат или поли-D(-)-3-гидроксibuтириновую кислоту. Композиции с замедленным высвобождением могут также включать в себя липосомы, которые могут быть приготовлены любым из нескольких методов, известных в данной области.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, обычно должны быть стерильными. Этого можно добиться путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации. Если композиция лиофилизована, стерилизация с использованием этого метода может проводиться либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизованной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий отверстие для стерильного доступа, например, пакет для раствора для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, выполненную с возможностью прокалывания иглой для подкожных инъекций.

После составления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде дегидратированного или лиофилизованного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизованной), требующей восстановления перед введением.

Описание также включает наборы для приготовления однодозовой формы введения. Каждый из наборов может содержать как первый контейнер с высушенным белком, так и второй контейнер с водным составом. Также в объем настоящего описания включены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

Эффективное количество фармацевтической композиции связывающего белка для терапевтического применения будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в данной области будет очевидно, что надлежащие уровни дозировки для лечения будут, таким образом, варьироваться в зависимости, в частности, от доставляемой молекулы, показаний, по которым применяется связывающий белок, способа введения и размера (массы тела, площади поверхности тела или размера органов) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. Соответственно, врач может титровать дозу и модифицировать способ введения для достижения оптимального терапевтического эффекта.

Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров связывающего белка в используемом составе. В большинстве случаев врач будет вводить композицию до достижения такой дозировки, которая обеспечивает

5
желаемый эффект. Таким образом, композицию можно вводить в виде однократной дозы, в виде двух или более доз (которые могут содержать или не содержать одно и то же количество желаемой молекулы) в течение некоторого времени или в виде непрерывной инфузии через имплантированное устройство или катетер. Последующая корректировка надлежащей дозировки обычно осуществляется рядовыми специалистами в данной области и находится в рамках задач, выполняемых ими в повседневной практике. Надлежащие дозировки можно подтвердить посредством использования соответствующих данных о зависимости ответа от дозы.

10
Метод введения фармацевтической композиции соответствует известным методам, например, перорально; посредством инъекции внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутривнутричерепральным (интрапаренхиматозным), интрачерепровентрикулярным, внутримышечным, внутривнутриглазным, внутривнутриартериальным, внутривнутрипортальным или внутривнутриочаговым способами; посредством систем замедленного высвобождения; или посредством имплантированных устройств. При необходимости композиции можно вводить посредством болюсной инъекции или непрерывно посредством инфузии или посредством имплантированного устройства.

15
Композицию можно также вводить локально посредством имплантации мембраны, губки или другого надлежащего материала, в который была адсорбирована или инкапсулирована желаемая молекула. При использовании имплантированного устройства такое устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка желаемой молекулы может осуществляться посредством диффузии, болюса с контролируемым по времени высвобождением или непрерывного введения.

20
В настоящем описании также предложен метод лечения множественной миеломы у нуждающегося в этом субъекта. В методе используется гетеродимерное антитело, которое взаимодействует одновременно с CD47 и CD38 таким образом, чтобы обеспечивать временный контакт между злокачественными клетками и Т-клетками, тем самым индуцируя опосредованное Т-клетками уничтожение связанной злокачественной клетки. В методе, описанном в настоящем документе, используется гетеродимерное антитело, которое связывает CD47 и CD38 таким образом, чтобы обеспечивать максимальное разрушение клеток-мишеней, одновременно снижая нежелательные побочные эффекты (например, неконтролируемое высвобождение цитокинов).

25 Схема лечения

30
Гетеродимерное антитело вводят нуждающемуся в этом субъекту, например, субъекту человека, страдающему от множественной миеломы, такой как рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома. Рецидивирующая миелома характеризуется как повторное проявление заболевания после предшествующего ответа на лечение. Примеры лабораторных и радиологических критериев, сигнализирующих о заболевании, включают, без ограничений, увеличение на > 25% моноклонального белка (М-белка) в сыворотке или моче или разницу > 25% между затронутыми и незатронутыми свободными легкими цепями в сыворотке по сравнению с нижней точкой соответственно или развитие новых плазмоцитом или гиперкальциемию. Sonneveld et al., Haematologica. 2016 Apr; 101(4): 396–406.

У пациентов с несекреторным заболеванием рецидив характеризуется увеличением плазмоцитов костного мозга. Сигнал о рецидивирующем заболевании также характеризуется появлением или повторным появлением одного или более критериев CRAB или быстрым и устойчивым биохимическим рецидивом. Рефрактерная миелома представляет собой миелому, которая не отвечает на лечение. Рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома относится к

5 заболеванию, которое перестает отвечать на лечение или прогрессирует в ходе лечения или в течение 60 дней после последнего лечения у пациентов, которые ранее достигли по меньшей мере минимального ответа на предыдущее лечение. Sonneveld, supra; Anderson et al., *Leukemia*. 2008;22(2):231–239.

Метод описания включает введение субъекту дозы от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 200 мг гетеродимерного антитела. Доза в различных вариантах осуществления составляет от приблизительно 0,5 мг до

10 приблизительно 200 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 150 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 12 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 12 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 36 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 36 мг до приблизительно 100 мг или от приблизительно 100 мг до приблизительно 200 мг. В

15 различных аспектах метода доза, вводимая субъекту, составляет приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,15 мг, приблизительно 0,45 мг, приблизительно 1,35 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 36 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 200 мг.

В альтернативных аспектах однократная доза гетеродимерного антитела составляет по меньшей мере приблизительно 0,05 мг, по меньшей мере приблизительно 0,15 мг, по меньшей мере приблизительно 0,45 мг, по меньшей мере

20 приблизительно 1,35 мг, по меньшей мере приблизительно 4 мг, по меньшей мере приблизительно 12 мг, по меньшей мере приблизительно 36 мг или по меньшей мере приблизительно 100 мг. В различных аспектах однократная доза гетеродимерного антитела составляет не более чем приблизительно 200 мг (например, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 36 мг). Следует понимать, что однократная доза может вводиться посредством

25 многократных введений (т. е. разделенной дозы) таким образом, чтобы многократные введения в сумме составляли дозу, указанную в настоящем документе. Например, многократные введения (например, две или более инъекции) суммируются таким образом, чтобы составлять по меньшей мере приблизительно 0,05 мг, по меньшей мере

30 приблизительно 0,15 мг, по меньшей мере приблизительно 0,45 мг, по меньшей мере приблизительно 1,35 мг, по меньшей мере приблизительно 4 мг, по меньшей мере приблизительно 12 мг, по меньшей мере приблизительно 36 мг или по меньшей мере приблизительно 100 мг. В различных аспектах многократные введения однократной дозы гетеродимерного антитела суммируются таким образом, чтобы составлять не более чем приблизительно 200 мг (например, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 36 мг).

В различных аспектах метода доза корректируется в течение курса лечения. Например, субъекту вводят начальную дозу в рамках одного или более введений, а более высокая доза используется в рамках одного или более последующих введений. Другими словами, в настоящем описании рассматривается увеличение дозы гетеродимерного антитела по

меньшей мере один раз в течение курса лечения. Альтернативно доза может быть снижена в течение курса лечения таким образом, чтобы количество гетеродимерного антитела уменьшалось по мере прогрессирования лечения.

5 В описании рассматривается метод, при котором многократные (т. е. две или более) дозы гетеродимерного антитела вводятся в течение периода лечения. Индивидуальные дозы можно вводить с любым интервалом, таким как один раз
10 в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. Индивидуальные дозы можно вводить каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. Иными словами, в некоторых аспектах между введениями гетеродимерного антитела субъекту проходит период ожидания, составляющий две недели. Период ожидания между введениями доз не должен быть постоянным в течение периода лечения. Иными словами, интервал между дозами может корректироваться в течение курса лечения. В некоторых аспектах метод
15 предусматривает введение субъекту двух доз гетеродимерного антитела в неделю в первую и вторую недели лечения (т. е. два раза в неделю в течение недель 1 и 2), введение субъекту одной дозы гетеродимерного антитела в неделю в третью и четвертую недели лечения (т. е. один раз в неделю в течение недель 3 и 4) и введение одной дозы гетеродимерного антитела каждые две недели начиная с недели 5 вплоть до конца лечения (т. е. предусматривается период ожидания продолжительностью две недели между дозами начиная с недели 5 вплоть до конца лечения). Не
ограничиваясь рамками какой-либо конкретной теории, можно отметить, что более короткий интервал между дозами для первых введений (например, две дозы в неделю) способствует быстрому клиренсу клеток-мишеней. Увеличение интервала между дозами, как изложено в настоящем документе, поддерживает клиренс клеток, одновременно сводя к минимуму нежелательные побочные эффекты, ассоциированные с иммунотерапией.

20 Альтернативно в различных аспектах метод предусматривает введение одной дозы гетеродимерного антитела в неделю в течение недель 1–4 лечения и при необходимости введение одной дозы гетеродимерного антитела каждые две недели начиная с недели 5 вплоть до конца лечения.

Многократные дозы гетеродимерного антитела вводят в течение периода лечения, составляющего, например, от трех месяцев до приблизительно 18 месяцев, или от приблизительно трех месяцев до приблизительно 12 месяцев, или от
25 приблизительно трех месяцев до приблизительно девяти месяцев, или от приблизительно трех месяцев до приблизительно шести месяцев, или от приблизительно трех месяцев до приблизительно восьми месяцев, или от приблизительно шести месяцев до приблизительно 18 месяцев, или от приблизительно шести месяцев до приблизительно 12 месяцев, или от приблизительно восьми месяцев до приблизительно 12 месяцев, или от приблизительно шести месяцев до приблизительно восьми месяцев, или от приблизительно восьми месяцев до приблизительно 12 месяцев (например, приблизительно восемь месяцев). При необходимости многократные (т. е. две
30 или более) дозы гетеродимерного антитела вводят в течение периода лечения, составляющего от приблизительно 12 недель до приблизительно 52 недель или от приблизительно 12 недель до приблизительно 36 недель или от приблизительно 24 недель до приблизительно 32 недель, причем дозы вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз каждые четыре недели.

35 Под «лечением» множественной миеломы подразумевается достижение любого положительного терапевтического ответа в отношении заболевания. Например, положительный терапевтический ответ включает в себя одно или более

из следующих улучшений течения заболевания: (1) уменьшение количества неопластических клеток; (2) увеличение гибели неопластических клеток; (3) ингибирование выживаемости неопластических клеток; (4) уменьшение продукции парапротеина опухолевыми клетками; (5) ингибирование (т. е. замедление до некоторой степени, предпочтительно остановка) роста опухоли; (6) увеличение уровня выживаемости пациента; и (7) некоторое

5 облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием. Ответ опухоли можно оценить с точки зрения изменений морфологии опухоли (т. е. общей опухолевой нагрузки, размера опухоли и т. п.) с использованием методик скрининга, таких как сканирование с помощью магниторезонансной томографии (МРТ), рентгенографическая визуализация, сканирование с помощью компьютерной томографии (КТ), сканирование для визуализации костей, эндоскопия и забор материала опухоли на биопсию, включая аспирацию костного мозга (АКМ)

10 и подсчет опухолевых клеток в кровотоке. Полный терапевтический ответ (т. е. отсутствие клинически обнаруживаемого заболевания с нормализацией любых предшествующих аномальных радиографических исследований, костного мозга и спинномозговой жидкости (СМЖ) или аномального моноклонального белка) не требуется; во внимание принимается любая степень улучшения. Различные дополнительные параметры, ассоциированные с лечением заболевания и улучшением, представлены в примерах.

15 Гетеродимерное антитело может вводиться с помощью любых подходящих для субъекта средств, например, внутривенным, внутриартериальным, внутрелимфатическим, внутритекальным, внутрицеребральным, внутрибрюшинным, внутрицереброспинальным, внутридермальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, пероральным, топическим или ингаляционным способами. Например, гетеродимерное антитело может вводиться посредством внутривенного введения в виде болуса или посредством непрерывной инфузии в

20 течение некоторого периода времени. В различных аспектах метод предусматривает введение гетеродимерного антитела посредством внутривенной инфузии в течение периода от приблизительно 30 минут до приблизительно четырех часов. При необходимости время инфузии сокращают при последующих введениях. Например, в одном варианте осуществления первую дозу гетеродимерного антитела вводят в течение периода, составляющего

25 приблизительно четыре часа, а последующие дозы вводят в течение периода, составляющего два часа или менее. В этом отношении первая доза гетеродимерного антитела при необходимости вводится в течение периода, составляющего приблизительно четыре часа, вторая доза гетеродимерного антитела при необходимости вводится в течение периода, составляющего приблизительно два часа, и последующие дозы при необходимости вводятся в течение периода, составляющего приблизительно 30 минут.

В некоторых случаях субъект ранее получал лечение по поводу множественной миеломы. Например, субъекту могли

30 ранее вводить иммуномодулирующее лекарственное средство (талидомид, леналидомид, помалидомид), ингибитор протеосом (такой как помалидомид, бортезомиб или карфилзомиб), дексаметазон, доксорубицин или их комбинации.

Необязательно субъект ранее получал лечение моноспецифическим антителом к CD38, таким как даратумумаб (DARZALEX®). В различных вариантах осуществления у субъекта имеет место рецидив или рефрактерность к

предшествующему лечению моноспецифическим антителом к CD38. Если пациент получал лечение

35 моноспецифическим антителом к CD38, исходная доза гетеродимерного антитела предпочтительно вводится после

периода вымывания, достаточного для уменьшения системной концентрации моноспецифического антитела к CD38 до 0,2 пг/мл или менее. Другими словами, метод предусматривает период ожидания между предыдущим введением моноспецифического антитела к CD38 и введением гетеродимерного антитела. В различных вариантах осуществления метод предусматривает прекращение лечения моноспецифическим антителом к CD38 на по меньшей мере 12 недель (например, от приблизительно 13 до приблизительно 15 недель) перед введением начальной дозы гетеродимерного антитела.

Комбинированная терапия

Необязательно гетеродимерное антитело является частью схемы лечения, которая включает в себя введение одного или более других терапевтических агентов, лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток и т. п.

- 10 Метод описания необязательно дополнительно предусматривает введение дексаметазона субъекту. Дексаметазон можно вводить любым способом, таким как способы, описанные в настоящем документе. Предпочтительно дексаметазон вводят внутривенно или перорально. Если дексаметазон вводится внутривенно, его при необходимости вводят субъекту в течение одного часа до введения гетеродимерного антитела. Дексаметазон при необходимости вводят в количестве приблизительно 8 мг или приблизительно 4 мг.
- 15 В различных вариантах осуществления метод описания дополнительно предусматривает введение химиотерапевтического препарата. Не имеющие ограничительного характера примеры повреждающих ДНК химиотерапевтических препаратов включают ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан, топотекан, камптотecin и их аналоги или метаболиты и доксорубин); ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, тенипозид и даунорубин); алкилирующие агенты (например, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, тиотепа,
- 20 ифосфамид, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, декарбазин, метотрексат, митомицин C и циклофосфамид); интеркаляторы ДНК (например, цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин); интеркаляторы ДНК и генераторы свободных радикалов, такие как блеомицин; и миметики нуклеозидов (например, 5-фторурацил, капецитин, гемцитабин, флударабин, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и гидроксимочевина).

- Химиотерапевтические препараты, которые нарушают репликацию клеток, включают: паклитаксел, доцетаксел и связанные аналоги; винкристин, винбластин и связанные аналоги; талидомид, леналидомид и связанные аналоги (например, CC-5013 и CC-4047); ингибиторы протеинтирозинкиназы (например, мезилат иматиниба и гефитиниб); ингибиторы протеосом (например, бортезомиб, CEP-18770, MG132, пептидвинилсульфоны, пептидэпоксикетоны (такие как эпоксомидин и карфилзомиб), ингибиторы бета-лактонов (такие как лактацистин, MLN 519, NPI-0052, салиноспирамид A), соединения, которые образуют дитиокарбаматные комплексы с металлами (такие как дисульфирам) и определенные антиоксиданты (такие как эпигаллокатехин-3-галлат, катехин-3-галлат и
- 30 салиноспирамид A); ингибиторы NF-κB, включая ингибиторы ИКВ-киназы; антитела, которые связываются с белками, сверхэкспрессируемыми при формах рака, и тем самым снижают репликацию клеток (например, трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб и бевацизумаб); и другие ингибиторы белков или ферментов, в отношении которых известно,

что они демонстрируют повышение экспрессии, сверхэкспрессируются или активируются при формах рака, ингибирование которых снижает репликацию клеток.

5 Схема лечения может включать введение других терапевтических антител, таких как элотузумаб (гуманизированное моноклональное антитело к SLAMF7; Tai et al., Blood, 2008;112:1329–37); даратумумаб, MOR202 и изатуксимаб, мишенью которых является CD38; пBT062-SMCC-DM1, пBT062-SPDB-DM4 и пBT062-SPP-DM1, мишенью которых является CD138; лугатумумаб (также известный как HCD122) и дацетузумаб (также известный как SGN-40), мишенью которых является CD40; лорвотузумаб, мишенью которого является CD56. Обзор терапевтических антител для лечения множественной миеломы см., например, в работах Tandon et al., Oncology & Hematology Review, 2015;11(2):115–21 и Sondergeld et al., Clinical Advances in Hematology & Oncology, 2015; 13(9), 599, обе включены в настоящий документ 10 путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления гетеродимерное антитело вводится до, одновременно с или после лечения Velcade® (бортезомибом), Thalomid™ (талидомидом), Aredia™ (памидронатом) или Zometa™ (золедроновой кислотой).

15 Все процитированные публикации в полном объеме в явной форме включены в настоящий документ путем ссылки. В то время как конкретные варианты осуществления изобретения были описаны выше для целей иллюстрации, специалистам в данной области будет очевидно, что многочисленные вариации деталей могут быть внесены без отступления от существа изобретения, как описано в прилагаемой формуле изобретения.

Фигуры

20 Фиг. 1. Блокирование взаимодействия CD47 человека/SIRP α человека при связывании Fab анти-CD47-H2 с CD47 человека по результатам оценки с помощью интерферометрии биослоя Octet. Бiotинилированный человеческий белок CD47-avi-his наносили на стрептавидиновый биосенсор SA. Fab анти-CD47-H2 вводили поверх иммобилизованного CD47 человека при 1 мкМ в кинетическом буфере для достижения насыщения поверхности. Затем предварительно смешанный раствор Fab анти-CD47 при 1 мкМ и SIRP α человека при конечной концентрации 2 мкМ вводили поверх насыщенной поверхности. График показывает связывание с верхушкой сенсора в виде сдвига длины волны (в нм; ось Y) в зависимости от времени (ось X). Кривые помечены в соответствии с названием клона Fab. 25

Фиг. 2. Эпитоп-специфическая сортировка клонов анти-CD38-E2 и анти-CD38-B6 с CD38 человека с помощью интерферометрии биослоя Octet. Бiotинилированный человеческий белок CD38-avi-his наносили на стрептавидиновый биосенсор SA. Fab анти-CD38-E2 вводили поверх иммобилизованного CD38 человека при 200 нМ в кинетическом буфере для достижения насыщения поверхности. Затем предварительно смешанный раствор Fab анти-CD38-E2 и Fab анти-CD38-B6 при конечной концентрации 200 нМ вводили поверх насыщенной поверхности. Такую же экспериментальную процедуру проводили с использованием Fab анти-CD38-H5 вместо Fab анти-CD38-B6 в качестве конкурентного контроля. График показывает связывание с верхушкой сенсора в виде сдвига длины волны (в 30

нм; ось Y) в зависимости от времени (ось X). Кривые помечены в соответствии с названием конкурирующего клона Fab.

Фиг. 3. Схематическое изображение биспецифического антитела BEAT CD38/CD47. A(-) означает отсутствие сайта связывания PA, в то время как A(+) означает наличие сайта связывания PA.

5 Фиг. 4. Анализ CDC на клетках Daudi, сравнивающий сконструированные варианты Fc с контролем без усиления.

Фиг. 5. Анализ ADCP на клетках Raji, сравнивающий сконструированные варианты Fc с контролем без усиления. Горизонтальная линия проведена через среднее кратное изменение фагоцитоза для BEAT CD38/CD47-19 без усиления для визуализации влияния конструирования Fc на активность ADCP.

10 Фиг. 6. Схематическое изображение биспецифического антитела BEAT CD38/CD47 «2 + 1». Биспецифические антитела BEAT «2 + 1» были сконструированы аналогично антителам в формате «1 + 1». «Дистальный Fc» домен Fab анти-CD38 был слит с N-концом домена VH «проксимального Fc» Fab анти-CD38.

Фиг. 7. Анализ CDC на клетках Daudi, сравнивающий антитела BEAT CD38/CD47 в форматах «2 + 1» и «1 + 1».

Фиг. 8. Анализ ADCP на клетках Raji, сравнивающий антитела BEAT CD38/CD47 в форматах «2 + 1» и «1 + 1».

15 Горизонтальная линия проведена через среднее кратное изменение фагоцитоза для BEAT CD38/CD47-19 «1 + 1» без усиления для визуализации влияния формата «2 + 1» и конструирования Fc на активность ADCP.

Фиг. 9. Анализ CDC, ADCC и ADCP, сравнивающий BEAT CD38/CD47-42, -48 и -60.

Фиг. 10. Анализ термостабильности биспецифических антител CD38/CD47 с помощью ДСК. А, BEAT CD38/CD47-42. В, BEAT CD38/CD47-48. С, BEAT CD38/CD47-60.

20 Фиг. 11. Связывание BEAT CD38/47-48 и 60 оценивали с помощью проточной цитометрии на панели клеток лимфомы Daudi (A) и Raji (B) и клеток множественной миеломы KMS-12-PE (C), NCI-H929 (D) и KMS-12-BM (E). BEAT CD38/47-48 и BEAT CD38/47-60 демонстрируют более эффективное дозозависимое связывание с линиями опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии CD38 и CD47 по сравнению с эталонами.

25 Фиг. 12. (A) BEAT CD38/47-48 и BEAT CD38/47-60 блокируют взаимодействие CD47/SIRP α на уровне, сравнимом с эталонным высокоаффинным антителом к CD47, фон изотипического контроля отображен в виде пунктирной линии; (B) Кумулятивный анализ максимального ингибирования CD47/SIRP α и EC50.

Фиг. 13. Анализ ADCP, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{high} (Daudi) или CD38^{low} (KMS12-BM). (A-C) две репрезентативные кривые фагоцитоза опухолевых клеток Daudi (A) или KMS12-BM (C). Среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения (CO). (B-D) Совокупные анализы максимального фагоцитоза и EC50 в множественных экспериментах с опухолевыми клетками Daudi (B) или KMS12-BM (D). Приводится среднее значение для n = 9

экспериментов +/- СО. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

5 Фиг. 14. Анализ ADCP, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{low} (KMS12-BM). (А) Схематическое представление молекулярных структур и аффинностей плеч Fab. (В–С) Совокупные анализы максимального фагоцитоза (В) и EC50 (С) в множественных экспериментах с опухолевыми клетками KMS12-BM. Приводится среднее значение для n = 7 экспериментов +/- СО.

10 Фиг. 15. Анализ CDC, проведенный с опухолевыми клетками, экспрессирующими CD38^{high} (Daudi). (А) Репрезентативная кривая специфического уничтожения. Здесь приводится среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения (СО). (В) Совокупные анализы максимального уничтожения и EC50 в множественных экспериментах. Приводится среднее значение для n = 5 экспериментов +/- СО. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

15 Фиг. 16. Анализ ADCP, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{high} (Raji) или CD38^{low-int} (NCI-H929). (А–С) Две репрезентативные кривые специфического уничтожения опухолевых клеток Raji (А) или NCI-H929 (С). Среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения (СО). (В–D) Совокупные анализы максимального уничтожения ADCC и EC50 в множественных экспериментах с опухолевыми клетками Raji (В) или NCI-H929 (D) (Daudi). Приводится среднее значение для n = 3 экспериментов +/- СО. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

20 Фиг. 17. Анализ ММоАК, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{low-int} (NCI-H929). (А) Схематическое представление анализа. (В) Репрезентативная кривая уничтожения опухолевых клеток посредством ММоАК. Среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения (СО). (С–D) Совокупные анализы максимального уничтожения (С) и EC50 (D) в множественных экспериментах с использованием CD38^{low-int} (NCI-H929) в качестве клеток-мишеней. Приводится среднее значение для n = 9 экспериментов +/- СО. ADCC = антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCP = антителозависимый клеточный фагоцитоз; CDC = комплемент-зависимая цитотоксичность; ADCC = антителозависимый клеточный фагоцитоз; CDC = комплемент-зависимая цитотоксичность. Если кривые
25 уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

30 Фиг. 18. Анализ ММоАК, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{low-int} (NCI-H929) в присутствии антиген-зависимого клиренса. (А–D) Совокупные анализы максимального уничтожения (А–В) и EC50 (С–D) в множественных экспериментах с использованием CD38^{low-int} (NCI-H929) в присутствии 5 миллионов/мл эритроцитов (А–С) или 2,8 нг/мл sCD38 (В–D) для антиген-зависимого клиренса. Приводится среднее значение для n = 3–5 экспериментов +/- СО. Статистика: парный Т-критерий. НЗ = не значимый; эритроциты = красные кровяные клетки; sCD38 = растворимый CD38.

Фиг. 19. (А–В) Анализ ММоАК, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{low-int} (NCI-H929). Представлены (А) репрезентативная кривая фагоцитоза опухолевых клеток и (В) совокупные анализы максимального фагоцитоза и EC50

в множественных экспериментах. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

5 Фиг. 20. (A–C) Репрезентативный эксперимент, демонстрирующий (A) связывание Darzalex (конъюгированного с AF647), (B) BEAT 38/47–60 (конъюгированного с AF488) или (C) смеси конъюгированного Darzalex и BEAT 38/47–60 в клетках Raji-CD47KO. (D) Процент конкуренции с BEAT 38/47–60 (конъюгированного с AF488), опосредованной контрольным антителом (Ctrl IgG1), Darzalex или очищенными антителами BEAT 38/47–60, в клетках Raji-CD47KO.

10 Фиг. 21. (A–B) Анализ ADCP, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{high} (Daudi) или CD38^{low} (KMS12-BM). Две репрезентативные кривые фагоцитоза опухолевых клеток Daudi (A) или KMS12-BM (B) и совокупные анализы максимального фагоцитоза и EC50 в множественных экспериментах с опухолевыми клетками Daudi (A) или KMS12-BM (B). (C–D) Анализ ADCC, проведенный с опухолевыми клетками CD38^{high} (Raji) или CD38^{low-int} (NCI-H929). Две репрезентативные кривые специфического уничтожения опухолевых клеток Raji (C) или NCI-H929 (D). На графиках показаны совокупные анализы максимального уничтожения ADCC и EC50 в множественных экспериментах. (E–F) Анализ CDC, проведенный с опухолевыми клетками, экспрессирующими CD38^{high} (Daudi). (E) Репрезентативная кривая специфического уничтожения и (F) совокупные анализы максимального уничтожения и EC50 в множественных
15 экспериментах. На всех графиках репрезентативных кривых приводится среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения.

Фиг. 22. (A) Репрезентативные кривые связывания для нелинейной сигмоидной регрессии (относительное геометрическое среднее значение интенсивности флуоресценции) в эритроцитах здорового человеческого донора, проанализированных с помощью проточной цитометрии (n = 6). (B) Гемагглютинация, измеренная с помощью пробы Кумбса (n = 6). Степень агглютинации оценивали после центрифугирования от 0 (без агглютинации) до 4 (полная агглютинация). (C) Индуцирование истощения эритроцитов, оцененное собственными средствами с использованием гематологического анализатора (Sigma 5H). (D) Гемолиз, количественно определенный с помощью измерения поглощения гемоглобина в плазме при 414 нм с использованием спектрометрии. Результаты были нормализованы в программном обеспечении GraphPad Prism относительно условия без обработки антител (отрицательный контроль) и Triton X-100 (положительный контроль). (E) Агрегацию тромбоцитов относительно положительного контроля LeoA1 анализировали с помощью проточной цитометрии.
20
25

Фиг. 23. Репрезентативные кривые связывания для нелинейной сигмоидной регрессии (относительное геометрическое среднее значение интенсивности флуоресценции) у здорового человеческого донора, проанализированного с помощью проточной цитометрии с установкой окна типов клеток, как показано на каждом графике: (A) Т-клетки CD8+, (B) Т-клетки CD4+, (C) В-клетки, (D) гранулоциты и (E) миелоидные клетки. Связывание оценивали для шести разных доноров.
30

Фиг. 24. Контролируемый BEAT CD38/47–48 рост опухоли Raji при терапевтическом лечении при 10 мг/кг. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей Raji (n = 5 мышей/группа) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47–48 при 10 мг/кг (темно-серый),

BEAT CD38/47–48 при 1 мг/кг (серый), BEAT CD38/47–48 при 0,1 мг/кг (светло-серый). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Объем опухоли (+/- ст. ош. среднего) в день 27. Исследование Raj_9.

5 Фиг. 25. Контролируемый BEAT CD38/47–60 рост опухоли Raji при терапевтическом лечении при 10 мг/кг. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей Raji (n = 5 мышей/группа) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47–60 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47–60 при 1 мг/кг (серый), BEAT CD38/47–60 при 0,1 мг/кг (светло-серый). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Объем опухоли (+/- ст. ош. среднего) в день 27. Исследование Raj_9.

10 Фиг. 26. Контролируемый BEAT CD38/47–48 рост опухоли Raji при терапевтическом лечении. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей Raji (n = 10 мышей/группа; 5 мышей использовали для исследований ex vivo после дня 15) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47–48 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47–59 при 10 мг/кг (серый) и Darzalex (пунктирные линии с квадратами). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Объем опухоли (+/- ст. ош. среднего) в день 36, проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование Raj_10.

15

Фиг. 27. Контролируемый BEAT CD38/47–60 рост опухоли Raji при терапевтическом лечении. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей Raji (n = 10 мышей/группа; 5 мышей использовали для исследований ex vivo после дня 15) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47–60 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47–79 при 10 мг/кг (серый) и Darzalex (пунктирные линии с квадратами). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Объем опухоли (+/- ст. ош. среднего) в день 36, проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование Raj_10.

20

Фиг. 28. Контролируемый обоими из BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 рост опухоли Raji при терапевтическом лечении. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей Raji (n = 10 мышей/группа; 5 мышей использовали для исследований ex vivo после дня 15) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47–48 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47–60 при 10 мг/кг (серый) и Darzalex (пунктирные линии с квадратами). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Объем опухоли (+/- ст. ош. среднего) в день 36, проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование Raj_10.

25

30

Фиг. 29. Уровни IL-1b и макрофаги МНСII+ в опухолях. Через 16 дней после введения ксенотрансплантата 5 животных на группу были умерщвлены. Сыворотку и опухоли мышей собирали и анализировали ex vivo с помощью Lumiplex (А) и FACS (В). BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 продемонстрировали тенденцию к снижению уровня IL-1b

в опухолях (А). BEAT CD38-CD47-60 продемонстрировал значимое снижение макрофагов MHCII⁺ в опухолях (В). Проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование Raj_10.

5 Фиг. 30. Контролируемый BEAT CD38/47-48 рост опухоли KMS-12-ВМ при терапевтическом лечении при 10 мг/кг. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей KMS-12-ВМ (n = 5 мышей/группа) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47-48 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47-48 при 1 мг/кг (серый), BEAT CD38/47-48 при 0,1 мг/кг (светло-серый) и Darzalex (пунктирные линии с квадратами). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Рост опухоли с момента рандомизации (ΔT) (+/- ст. ош. среднего) в день 37. Проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование KMS_7.

15 Фиг. 31. Контролируемый BEAT CD38/47-60 рост опухоли KMS-12-ВМ при терапевтическом лечении при 10 мг/кг. А. Рост опухоли (+/- ст. ош. среднего) с течением времени у мышей, которым был введен подкожный ксенотрансплантат опухолей KMS-12-ВМ (n = 5 мышей/группа) и которые получали PBS (черный), BEAT CD38/47-60 при 10 мг/кг (темно-серый), BEAT CD38/47-60 при 1 мг/кг (серый), BEAT CD38/47-60 при 0,1 мг/кг (светло-серый) и Darzalex (пунктирные линии с квадратами). Лечение проводили, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм³. В. Рост опухоли с момента рандомизации (ΔT) (+/- ст. ош. среднего) в день 37. Проведенный статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. Исследование KMS_7.

Пример 1. Получение антител к CD47

Материал и методы

Рекомбинантные антигены

25 Оптимизированные по кодонам человека последовательности, кодирующие полноразмерную CD47 человека (№ доступа UniProt: Q08722; SEQ ID NO: 7) и полноразмерную CD47 яванского макака (№ доступа: A0A2K5X4I2, SEQ ID NO: 8), были синтезированы Twist Biosciences (г. Сан-Франциско, США). Растворимые внеклеточные области CD47 человека (остатки с 19 по 141; SEQ ID NO: 3) и CD47 яванского макака (остатки с 19 по 141; SEQ ID NO: 4) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNATM3.1 (ThermoFisher Scientific, № кат.: V79020) для получения белка с С-концевым AvitagTM (Avidity LLC) с последующим добавлением метки 10-His с линкерной последовательностью Gly₃ между двумя метками (сокращенно CD47-ECD-Avi-His человека и CD47-ECD-Avi-His яванского макака). Для обоих из белков человека и яванского макака цистеин, находящийся в положении 33, мутировали в серин для предотвращения мультимеризации. Экспрессионный вектор являлся носителем мышинного лидерного пептида VJ2C для стимуляции секреции продукта, а также последовательности OriP. Для экспрессии белка плазмиды, кодирующие CD47-ECD-Avi-

His человека и CD47-ECD-Avi-His яванского макака (остатки с 19 по 141; SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно), и некодирующую плазмиду совместно трансфицировали в суспензионно-адаптированные клетки HEK293-EBNA (стандарты ATCC-LGL; № кат. CRL-10852) с использованием полиэтиленimina (PEI; Polysciences). Вкратце, клетки готовили при 8 миллионах клеток на мл в RPMI 1640 (Biowest) с добавлением 0,1% Pluronic F-68 (Gibco). Затем клетки трансфицировали со смесью ДНК-PEI при 37 °C. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 (Sigma Aldrich) с добавлением фенолового красного и 4 mM L-глутамина и инкубировали в течение 5 дней с орбитальным встряхиванием при 37 °C, 5% CO₂ и 80% влажности. После экспрессии очищенные супернатанты готовили путем центрифугирования и фильтрации, pH доводили до 7,4 (4 °C) с использованием 1 M гидроксида натрия. В очищенный супернатант добавляли гранулы Ni-Sepharose Excell (GE Healthcare) и инкубировали в течение ночи при 4 °C с осторожным перемешиванием. Затем смеси загружали в колонки Econo-Columns (Bio-Rad Laboratories) для очистки самотеком. Гранулы сначала промывали 1×PBS, pH 7,4 (10 CV), затем 1×PBS с добавлением 20 mM имидазола (10 CV) и элюировали белки либо в одну стадию элюирования в 500 mM имидазола (9 × 1 CV), либо в соответствии с протоколом поэтапного элюирования с использованием последовательно 1×PBS, pH 7,4 с добавлением 40 mM (9 × 1 CV), 80 mM (11 × 1 CV), 250 mM (5 × 1 CV) и 500 mM (3 × 1 CV) имидазола. Фракции объединяли и дважды проводили диализ с 1×PBS, pH 7,4 при 4 °C. Качество белка оценивали по SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ, измерению эндотоксина и SPR, как описано выше. Помеченные гибридные белки CD47-ECD-Avi-His человека и яванского макака, как описано в настоящем документе, имеют SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

Оптимизированная по кодонам человека последовательность, кодирующая полноразмерную SIRPα человека (№ доступа UniProt: P78324-2), была синтезирована Twist Bioscience. Растворимые внеклеточные области SIRPα человека (остатки с 31 по 352; SEQ ID NO: 9) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNA™3.1 (ThermoFisher Scientific, кат. NO: V79020) для получения белка с C-концевым Avitag™ (Avidity LLC) с последующим добавлением метки 10-His с линкерной последовательностью Gly₃ между двумя метками (сокращенно SIRPα -ECD-Avi-His человека). Экспрессионный вектор являлся носителем мышиного лидерного пептида VJ2C для стимуляции секреции продукта, а также последовательности OriP. Для экспрессии белка плазмиды, кодирующие SIRPα-ECD-Avi-His человека (остатки с 31 по 352; SEQ ID NO: 9), и некодирующую плазмиду совместно трансфицировали в суспензионно-адаптированные клетки HEK293-EBNA (стандарты ATCC-LGL; № кат. CRL-10852) с использованием полиэтиленimina (PEI; Polysciences), как описано выше. После экспрессии в очищенный супернатант добавляли гранулы Ni-Sepharose Excell (GE Healthcare) и инкубировали в течение ночи при 4 °C с осторожным перемешиванием. Затем смеси загружали в колонки Econo-Columns (Bio-Rad Laboratories) для очистки самотеком. Гранулы сначала промывали в 1×PBS, pH 7,4 (10 CV), затем 1×PBS с добавлением 20 mM имидазола (10 CV) и элюировали белки в одну стадию элюирования в 500 mM имидазола (6 × 2 CV). Замену буфера на 1×PBS, pH 7,4 проводили на колонках PD-10 (GE). Качество белка оценивали по SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ, измерению эндотоксина и SPR, как описано выше. Помеченные гибридные белки SIRPα-ECD-Avi-His человека, как описано в настоящем документе, имеют SEQ ID NO: 9.

Оптимизированные по кодонам человека последовательности полноразмерной CD47 человека (ID последовательности UniProt Q08722; остатки 1–323; SEQ ID NO: 7) и полноразмерной CD47 яванского макака (№ доступа A0A2K5X4I2; остатки 1–323; SEQ ID NO: 8) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNA™3.1 (ThermoFisher Scientific, № кат.: V79020). Вектор также содержал усиленные гены зеленого флуоресцентного белка (eGFP) и гены резистентности к пурамицину (с интеркалированными элементами внутренних сайтов связывания рибосомы (IRES)). Для экспрессии белка вышеупомянутые плазмиды трансфицировали в суспензионно-адаптированные клетки CHO-S (приготовленные в соответствии с действующей НПП, Invitrogen, № кат.: A1136401) с использованием полиэтиленимина (PEI; Polysciences). Вкратце, клетки готовили при 2 миллионах клеток на мл в CD CHO (Gibco). Затем клетки трансфицировали со смесью ДНК-PEI при 37 °С. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в PowerCHO 2 (Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамина и инкубировали с орбитальным встряхиванием при 37 °С, 5% CO₂ и 80% влажности. Экспрессию целевых антигенов оценивали посредством мониторинга экспрессии репортерного белка eGFP с помощью флуоресцентного микроскопа. Помеченные гибридные белки CD47 человека и яванского макака, как описано в настоящем документе, имеют SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

Генерирование библиотеки

Библиотека, используемая в настоящем документе, была синтетического происхождения с разнообразием, ограниченным тяжелой цепью (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) и фиксированной легкой цепью VK3-15/JK1 (SEQ ID NO: 10). Библиотека содержала 4 разных подбиблиотеки на основе антител зародышевых линий VH1-69, VH3-23, VH3-15 и VH3-53. CDR были рандомизированы с использованием тримерных олигонуклеотидов. Праймеры, использовавшиеся для диверсификации CDR-H1 и CDR-H2, конструировали для каждой подбиблиотеки и кодировали специфическое по зародышевой линии разнообразие природного происхождения для остатков 27–35 и 50–58 по Кабату соответственно. CDR-H3 рандомизировали с использованием пула олигонуклеотидов, кодирующих 15 вариантов длины CDR-H3 (6–20) и специфическое по длине разнообразие природного происхождения для остатков 95–102 по Кабату. Диверсифицированные фрагменты scFv объединяли для имитации естественного распределения CDR-H3 по длине и клонировали в pNGLEN (модифицированный фагмидный вектор pUC119 собственной разработки) и полученную в результате реакцию лигирования электропорировали в клетки TG1 E. coli. Разнообразие каждой подбиблиотеки составляло от $1,2 \times 10^{10}$ до $1,7 \times 10^{10}$, совокупное разнообразие четырех подбиблиотек достигало $5,6 \times 10^{10}$.

Выбор библиотеки

Каждую подбиблиотеку выбирали либо индивидуально, либо в составе пула. Первая стратегия пэннинга предусматривала два раунда отбора с использованием рекомбинантного белка CD47 человека с последующими 2 раундами с использованием клеток CHO, экспрессирующих CD47 яванского макака. Вторая стратегия пэннинга предусматривала один раунд отбора с использованием рекомбинантного белка CD47 человека с последующими 3 раундами с использованием клеток CHO, экспрессирующих CD47 человека. Третья стратегия пэннинга предусматривала один раунд отбора с использованием клеток CHO, экспрессирующих CD47 человека, с последующими 3 раундами с использованием рекомбинантного белка CD47 человека.

- Для стратегий пэннинга с использованием рекомбинантных белков частицы очищенного фага (10^{12} бляшкообразующих единиц) и магнитные гранулы Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen, № кат.: 65002) блокировали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 3% (масс./об.) обезжиренного молока (3% MPBS), в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Отсевание фагов проводили по предварительно заблокированным гранулам в течение 1 ч при КТ. Отсеянные фаги инкубировали с 100 нМ биотинилированного рекомбинантного белка CD47-avi-his человека, полученного в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 3), в течение 2 ч при КТ. Связанные с антигеном фаги фиксировали на гранулах стрептавидина в течение 30 мин при КТ и гранулы пять раз промывали PBS, содержащим 0,1% (об./об.) Tween (PBS-Tween 0,1%), и дважды PBS. Фаги элюировали со 100 мМ триэтиламина в течение 10 мин при КТ и нейтрализовали с использованием Tris-HCl 1 М pH 8. Элюированные фаги использовали для инфицирования 10 мл экспоненциально растущих клеток TG1 *E. coli*. Инфицированные клетки выращивали в среде 2YT в течение 1 ч при 37 °C и 100 оборотах в минуту (об/мин), затем рассеивали на агаровые планшеты с 2YTAG (средой 2YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы) и инкубировали в течение ночи (ТН) при 30 °C. Колонии собирали с планшетов в 10 мл 2YT и добавляли 15% глицерина (об./об.) для хранения при -80 °C. Клетки TG1 из исходных растворов в глицерине выращивали при 37 °C и 240 об/мин в среде 2YTAG до тех пор, пока оптическая плотность при 600 нм не достигала 0,5. Затем клетки суперинфицировали хелперным фагом M13K07 с использованием 10 множественных инфекций (МОИ) в течение 1 ч при 37 °C и 100 об/мин. Затем культуральную среду заменяли на 2YТАК (среду 2YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина) и клетки дополнительно культивировали ТН при 30 °C и 280 об/мин. На следующий день 10 мкл бесклеточного супернатанта, содержащего фаг, использовали для последующего раунда отбора.
- Для стратегий пэннинга с использованием клеток CHO очищенные частицы фага блокировали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (PBS/BSA 3%), в течение 1 ч при КТ. 2×10^7 нетрансфицированных клеток CHO и 2×10^7 клеток CHO, транзитентно экспрессирующих белок CD47 человека (SEQ ID NO: 7) или белок CD47 яванского макака (SEQ ID NO: 8), блокировали PBS/BSA 3% с добавлением 0,1% азида во избежание интернализации рецептора в течение 1 ч при КТ. Отсевание фагов проводили по нетрансфицированным клеткам в течение 1 ч при КТ. Затем отсеянные фаги инкубировали с трансфицированными клетками в течение 2 ч при КТ. Для удаления неспецифических фагов клетки промывали четыре раза PBS-Tween 0,1% и дважды PBS. Фаги элюировали с 76 мМ лимонной кислоты, pH 2,0, в течение 10 мин при КТ и нейтрализовали с использованием Tris-HCl 1 М pH 8. Элюированные фаги использовали для инфицирования 10 мл экспоненциально растущих клеток TG1 *E. coli*. Амплификацию фагов проводили, как описано выше.
- Скрининг scFv методом SPR
- Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) использовали для подтверждения специфической связывающей активности клонов scFv. Измерения проводили на приборе Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare) с использованием программного обеспечения Biacore 2000 Control Software v3.2 при комнатной температуре и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1) того же производителя.
- Рекомбинантный белок CD47-avi-his человека, полученный в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 3), и

рекомбинантный белок CD47-avi-his яванского макака, полученный в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 4), по отдельности разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере с pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100350) и затем иммобилизовали в канале потока 2 и 3 соответственно до уровня приблизительно 1500 резонансных единиц (сокращенно RU) на CM5 Sensor Chips (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100012) с использованием набора для связывания по аминокислоте (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100050). Канал потока 4 аналогичным образом иммобилизовали с нерелевантным белком. HBS-EP (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100188) использовали в качестве подвижного буфера. Фильтрованные периплазматические экстракты вводили непосредственно в CM5 Sensor Chip с ковалентно связанными CD47 человека и CD47 яванского макака. Образцы вводили в каналы потока 1, 2, 3 и 4 (канал потока 1 использовали в качестве эталона) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин с последующим временем диссоциации 3 мин в подвижном буфере. После каждого акта связывания поверхность регенерировали с помощью 10 мМ раствора глицина с pH 1,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100354), вводившегося в течение 1 мин при 30 мкл/мин. Каждое измерение включало образцы с нулевой концентрацией, а также нерелевантные периплазматические экстракты scFv для сравнения и специфичности соответственно.

Скрининг scFv с помощью проточной цитометрии

Связывание клонов scFv с клетками CHO, транзистентно экспрессирующими белок CD47 человека (SEQ ID NO: 7), оценивали с помощью проточной цитометрии. Отдельные колонии *E. coli* из третьего или четвертого раунда отбора выбирали и выращивали в среде 2YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 0,1% глюкозы в 96-луночных глубоких планшетах. Экспрессию scFv индуцировали добавлением 0,02 мМ IPTG и инкубированием ТН при 30 °С и 250 об/мин. Клетки центрифугировали и получали периплазматические экстракты ресуспендированием бактериальных гранул в буфере TES (50 мМ Tris-HCl pH 8; 1 мМ EDTA pH 8; 20% сахарозы) с последующим инкубированием на льду в течение 30 мин. Клеточные остатки удаляли центрифугированием и содержащие scFv супернатанты использовали в эксперименте по проточной цитометрии. Экспрессирующие CD47 и нетрансфицированные клетки CHO высевали при плотности 10^5 клеток/луночка в планшеты для микротитрования. Затем планшеты центрифугировали для удаления супернатанта клеток и добавляли в каждую лунку 100 мкл периплазматического экстракта, предварительно разбавленного 1 : 1 в PBS, содержащем 3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (PBS-BSA 3%), и дополнительно инкубировали планшеты в течение 30 мин при 4 °С. Затем клетки промывали с PBS-BSA 3% и инкубировали с биотинилированным куриным антителом к с-Мус (Gallus Immunotech, № кат.: ACMYC-B), разбавленным до 1 : 200 в PBS-BSA 3%, в течение 30 мин при 4 °С. Затем клетки промывали с PBS-BSA 3% и инкубировали со стрептавидином APC (eBioscience, № кат.: 17-4317), разбавленным до 1 : 100 в PBS-BSA 3%, в течение 30 мин при 4 °С. Наконец, измеряли флуоресценцию клеток в проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences).

Экспрессия Fab

кДНК, кодирующие различные константные области антитела, представляли собой ген, синтезированный с помощью GENEART AG (г. Регенсбург, Германия) и модифицированный с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Продукты ПЦР расщепляли с надлежащими ферментами рестрикции ДНК, очищали и лигировали с модифицированными плазмидами pcDNA3.1 (Invitrogen), которые переносили промотор CMV и сигнал

полиаденилирования гена гормона роста быка (поли(A)). Экспрессионные векторы также переносили ОпР, которая является источником репликации плазмиды вируса Эпштейна — Барр и мышинового лидерного пептида VJ2С для секреции кодируемой полипептидной цепи. Для реформатирования клонов библиотеки scFv в Fab-фрагменты IgG1 человека каждый клон scFv в своем векторе библиотеки фагов использовали для амплификации своих отдельных кДНК

5 VH с помощью ПЦР, после чего продукт ПЦР VH клонировали в модифицированном векторе pcDNA 3.1, описанном выше, до кДНК, кодирующей домен СН1 тяжелой цепи IgG1 человека, в то время как фиксированную легкую цепь VK3-15/JK1 (SEQ ID NO: 10) клонировали в модифицированном векторе pcDNA 3.1, описанном выше, до кДНК, кодирующей константный домен легкой цепи каппа человека.

Для экспрессии Fab равные количества векторов тяжелой цепи и легкой цепи совместно трансфицировали в

10 суспензионно-адаптированные клетки HEK293-EBNA (ATCC, № кат. CRL-10852) с использованием PEI. Как правило, клетки готовили при 8 миллионах клеток на мл в RPMI с добавлением 0,1% Pluronic F-68. Затем клетки трансфицировали со смесью ДНК-PEI. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 с добавлением фенолового красного и 4 мМ L-глутамина и инкубировали в течение 5 дней с орбитальным встряхиванием при 37 °С, 5% CO₂ и 80% влажности. Бесклеточные супернатанты культуры, содержащие

15 рекомбинантные белки, готовили путем центрифугирования с последующей фильтрацией и использовали для дальнейшей очистки. Белки Fab очищали с использованием аффинной матрицы CaptureSelect™ IgG-CH1 (ThermoScientific, № кат.: 194320050). К отфильтрованным супернатантам культуры добавляли аффинную смолу и инкубировали ТН при 4 °С с осторожным перемешиванием. На следующий день гранулы смолы собирали в колонки Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories), промывали с PBS и рекомбинантные белки элюировали кислым буфером (обычно глицином 0,1 М рН 3). После нейтрализации с 1/10 объема Tris-HCl рН 8 проводили замену буфера в препаратах на PBS.

20

Аффинности связывания Fab для CD47

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) использовали для измерения аффинностей связывания Fab-фрагментов для CD47 человека и яванского макака. Аффинности измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при

25 °С и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (v3.1). Измерения проводили на Series S CM5 Sensor Chips (Biacore, GE Healthcare, №.кат.: BR100530) с использованием рекомбинантных белков CD47-avi-his человека и рекомбинантных белков CD47-avi-his яванского макака, полученных в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно). Рекомбинантный белок CD47 человека и рекомбинантный

30 белок CD47 яванского макака ковалентно иммобилизовали до приблизительно 50 RU в канале потока 2 и канале потока 4 соответственно на поверхности Sensor Chip с использованием доступного в продаже набора для связывания по аминокгруппе Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100050). Fab-фрагменты вводили в кинетику одиночного цикла в различных концентрациях в диапазоне от 15,6 до 2000 нМ в буфер HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин в канале потока 1, 2, 3 и 4 (канал потока 1 и 3 использовали в качестве эталона). Диссоциацию отслеживали в течение 5 мин. После каждого цикла поверхность Series S CM5 Sensor Chip,

35 покрытую рекомбинантными белками CD47, регенерировали с 30 мкл 10 мМ глицина рН 1,5 (Biacore, GE Healthcare,

№ кат.: BR100354). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием ленгмюровской модели аппроксимации кинетической функции 1 : 1. Измерения включали образцы нулевой концентрации для сравнения. Хи-квадрат, U- и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

5 *Анализ блокирования CD47/SIRPα*

Способность Fab-фрагментов блокировать взаимодействие между CD47 человека и SIRPα человека оценивали с помощью интерферометрии биослоя (BLI). Измерения проводили на приборе OctetRED96e (ForteBio) и анализировали с использованием программного обеспечения Data Analysis HT версии 11.1 (Octet, ForteBio). Биотинилированный рекомбинантный белок CD47-avi-his человека, полученный в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 3), загружали при 1 мкг/мл в кинетическом буфере (ForteBio, № кат.: 18-1105) на стрептавидиновый биосенсор SA (ForteBio, № кат.: 15-5019) на 100 с. Стрептавидиновый биосенсор, покрытый биотинилированным антигеном CD47 человека, погружали в раствор 1 мкМ Fab на 10 мин для достижения насыщения поверхности, покрытой CD47, с последующим последовательным погружением в смешанный раствор 1 мкМ Fab 1 и 2 мкМ рекомбинантного белка SIRPα человека, полученного в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 9), на 5 мин. Все стадии проводили при 25 °С и встряхивании при 1000 об/мин. Свежие стрептавидиновые биосенсоры покрывали биотинилированным белком CD47 человека перед каждым циклом.

Результаты и выводы

Клоны ScFv, демонстрирующие специфическое связывание с рекомбинантным белком CD47 человека и с рекомбинантным белком CD47 яванского макака по результатам SPR, а также те, которые в ходе тестирования демонстрировали специфическое связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD47, секвенировали и уникальные последовательности реформатировали в Fab-фрагмент для дальнейшего определения характеристик. Определение биохимических характеристик включало в себя оценку аффинностей связывания, и функциональную оценку проводили с использованием анализа блокирования CD47/SIRPα человека.

Аффинности связывания Fab для CD47

25 Как было определено методом SPR, двадцать один клон Fab продемонстрировал аффинности связывания с CD47 человека и яванского макака с равновесной константой диссоциации (KD) ниже 2 мкМ. Клон анти-CD47-UCP01-H2, далее также называемый анти-CD47-H2, продемонстрировал аффинности к CD47 человека на уровне 104 нМ и к CD47 яванского макака на уровне 142 нМ. Идентификационные номера последовательности тяжелой цепи и аффинности связывания указанных клонов представлены в таблице 1.

30 Таблица 1. Общий обзор сконструированных клонов Fab и их относительная аффинность к CD47 человека и яванского макака.

Название клона	SEQ ID NO тяжелой цепи клона	KD CD47 человека (нМ)	KD CD47 яванского макака (нМ)
FAB анти-CD47-UCP01-A1	SEQ ID NO: 11	292	15,9
FAB анти-CD47-UCP01-G1	SEQ ID NO: 12	136	214
FAB анти-CD47-UCP01-A2	SEQ ID NO: 13	822	1070
FAB анти-CD47-UCP01-G2	SEQ ID NO: 14	183	190
FAB анти-CD47-UCP01-H2	SEQ ID NO: 15	878,3	939,3
FAB анти-CD47-UCP01-A3	SEQ ID NO: 16	1170	1260
FAB анти-CD47-UCP01-B3	SEQ ID NO: 17	316	340
FAB анти-CD47-UCP02-C1	SEQ ID NO: 18	193	113
FAB анти-CD47-UCP02-C2	SEQ ID NO: 19	1100	1230
FAB анти-CD47-UCP02-B3	SEQ ID NO: 20	1010	1120
FAB анти-CD47-UCP02-H3	SEQ ID NO: 21	455	17,8

Анализ блокирования CD47/SIRPα

Fab-фрагменты тестировали на предмет блокирования взаимодействия между CD47 человека и SIRPα человека с использованием интерферометрии биослоя. Все протестированные сконструированные Fab-фрагменты блокировали взаимодействие между CD47 человека и SIRPα человека. Блокирование взаимодействия между рекомбинантным белком CD47 человека и рекомбинантным белком SIRPα человека с клоном анти-CD47-H2 проиллюстрировано на Фиг. 1.

Пример 2. Получение антител к CD38

Материал и методы

Рекомбинантные целевые антигены

кДНК CD38 человека и яванского макака были получены от Source Biosciences (Erwin-Negelein-Haus, Германия, № кат.: IRAU37D11, 4309086), их внеклеточные области (№ доступа UniProt: P28907, остатки 43–300 и № доступа Uniprot: Q5VAN0, остатки 43–301 (остаток 44 был удален) соответственно) амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в экспрессионный вектор собственной разработки, полученный из pcDNA3.1 (Invitrogen AG). Этот экспрессионный вектор включал последовательность Козака и стартовый кодон с последующим добавлением мышинного лидерного пептида легкой цепи IgGκ на 5'-конце и 6-His-метки на 3'-конце его сайта множественного клонирования. Растворимую внеклеточную область CD38 человека (остатки с 43 по 300, SEQ ID NO: 1) и CD38 яванского макака (остатки 43–301, SEQ ID NO: 2), слитые с 6-His-меткой, экспрессировали следующим образом. Вкратце, один объем среды RPMI1640 (PAA Laboratories), содержащей клетки НЕК, 0,1% плюроновой кислоты (Invitrogen AG), экспрессионный вектор и полиэтиленимин (JetPEI[®], Polyplus-transfection, г. Илькирш, Франция) инкубировали во встряхиваемой колбе при 37 °C, 5% CO₂ и 80% влажности. Один объем среды Ex-Cell 293 с добавлением 6 мМ глутамин добавляли к смеси через 4 часа и продолжали инкубировать далее в течение в общей сложности 5 дней. После продукции очищенный

супернатант получали центрифугированием и фильтровали с использованием фильтров 0,2 мкм, pH корректировали до 7,4 (4 °C) с использованием Tris 1 М pH 8,7. В очищенный супернатант добавляли гранулы Ni-Sepharose Excell (GE Healthcare) и инкубировали в течение ночи при 4 °C с перемешиванием. Раствор загружали в колонки Econo-Columns (Bio-Rad Laboratories) для очистки самотеком. Затем гранулы промывали с 1×PBS, pH 7,4 (1 или 2X 10 CV) и 1×PBS, pH 7,4 с добавлением 20 мМ имидазола (10 CV). Белок в зависимости от партии либо элюировали 1×PBS, pH 7,4 с добавлением 500 мМ имидазола, либо элюировали посредством ступенчатого увеличения концентрации в имидазоле (40 мМ, 80 мМ и 250 мМ имидазола). Представляющие интерес фракции объединяли и дважды проводили диализ с 1×PBS, pH 7,4 при 4 °C. Белок концентрировали и фильтровали в стерильных условиях с использованием фильтров 0,22 мкм. Качество белка оценивали по SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ, измерению эндотоксина и ИФА. Вкратце, эксклюзионную ВЭЖХ проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWx1 (№ кат.: 08541, Tosoh Bioscience) при комнатной температуре с 0,1 М натрий-фосфатного буфера, 0,15 М хлорида натрия, pH 6,8 в качестве элюента при скорости потока 1 мл/мин в системе ВЭЖХ Waters Alliance 2695 с детектором Waters 2998 PDA (Waters) с мониторингом при 214 нм и 280 нм. Многокассетную систему Endosafe-MCS от Charles River с применением анализа на основе лизата амебоцитов мечехвоста (LAL) для подтверждения уровня бактериального эндотоксина ниже 0,5 ЭЕ/мг. Такие белки упоминаются в настоящем документе как CD38-C-His человека и CD38-C-His яванского макака и описаны как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Рекомбинантные клеточные линии

Оптимизированные по кодам человека последовательности полноразмерной CD38 человека (ID последовательности UniProt P28907; остатки 1–300; SEQ ID NO: 5), полноразмерной CD38 яванского макака (№ доступа: Q5VAN0; остатки 1–301; SEQ ID NO: 6) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNATM3.1 (ThermoFisher Scientific, № кат.: V79020). Трансфекцию и экспрессию белка проводили в суспензионно-адаптированных клетках CHO-S (приготовленных в соответствии с действующей НПП, Invitrogen, №. кат.: A1136401), как описано в примере 1. Помеченные гибридные белки CD38 человека и яванского макака, как описано в настоящем документе, имеют SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно.

Выбор библиотеки

Отборы проводили, как описано в примере 1, со следующими модификациями. Первая стратегия пэннинга предусматривала три раунда отбора с использованием биотинилированного рекомбинантного белка CD38 человека (Acbsystems, № кат.: CD8-H82E7). Вторая стратегия пэннинга предусматривала два раунда отбора с использованием биотинилированного рекомбинантного белка CD38 человека с последующими двумя раундами с использованием клеток CHO, транзистентно экспрессирующих белок CD38 человека (SEQ ID NO: 5) или белок CD38 яванского макака (SEQ ID NO: 6).

Скрининг scFv методом SPR

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) использовали для подтверждения специфической связывающей активности клонов scFv. Измерения проводили на приборе Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare) с использованием программного обеспечения Biacore 2000 Control Software v3.2 при комнатной температуре и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1) того же производителя.

5 Доступный в продаже рекомбинантный белок CD38 человека (Acbsystems, № кат.: CD8-H224) и рекомбинантный белок CD38 яванского макака (R&D Systems, № кат.: 9834-AC-050) или рекомбинантные белки внеклеточного домена (ECD)-C-his CD38 человека (SEQ ID NO: 1) и рекомбинантные белки CD38-ECD-C-his яванского макака (SEQ ID NO: 2), полученные в рамках собственной разработки, по отдельности разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100350) и затем иммобилизовали в канале потока 2 и 3

10 соответственно до уровня приблизительно 1500 резонансных единиц (сокращенно RU) на CM5 Sensor Chips (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100012) с использованием набора для связывания по аминокислоте (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100050). Канал потока 4 аналогичным образом иммобилизовали с доступным в продаже рекомбинантным мышинным белком CD38 (Creative Biomart, № кат.: CD 38-3112M) или с нерелевантным антигеном. HBS-EP (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100188) использовали в качестве подвижного буфера. Фильтрованные периплазматические

15 экстракты вводили непосредственно в CM5 Sensor Chip с ковалентно связанными CD38-his человека и CD38-his яванского макака. Образцы вводили в каналы потока 1, 2, 3 и 4 (канал потока 1 использовали в качестве эталона) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин с последующим временем диссоциации 5 мин в подвижном буфере. После каждого акта связывания поверхность регенерировали с помощью 10 мМ раствора глицина с pH 1,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100354), вводящегося в течение 1 мин при 30 мкл/мин. Каждое измерение включало образцы с

20 нулевой концентрацией, а также нерелевантные периплазматические экстракты scFv для сравнения и специфичности соответственно.

Скрининг scFv с помощью проточной цитометрии

Связывание клонов scFv с клетками CHO, транзигентно экспрессирующими белок CD38 человека (SEQ ID NO: 5), оценивали с помощью проточной цитометрии, как описано в примере 1.

25 *Аффинности связывания Fab для CD38*

Fab-фрагменты IgG1 человека экспрессировали и очищали, как описано в примере 1. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) использовали для измерения аффинностей связывания Fab-фрагментов для CD38 человека и яванского макака. Аффинности измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °C и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (v3.1). Измерения для CD38 человека проводили на Series S Sensor Chips SA (Biacore, GE Healthcare, №.кат.: BR100531) или Series S BiotinCAPture Chips (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28920234) с использованием доступного в продаже рекомбинантного биотинилированного CD38 человека Avitag™ His Tag (Acbsystems, № кат.: CD8-H82E7). Измерения для CD38 яванского макака проводили на Series S CM5 Sensor Chips (Biacore, GE Healthcare, №.кат.: BR100530), предварительно иммобилизованных с антигистидиновым антителом (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28995056), с использованием рекомбинантного белка CD38-ECD-C-his яванского

30 макака, полученного в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 2).

35

Аффинности к CD38 человека и яванского макака оценивали путем иммобилизации CD38 и использования Fab-фрагментов в качестве аналита. Биотинилированный рекомбинантный белок CD38 человека иммобилизовали до приблизительно 160 RU в канале потока 2 Series S Sensor Chip SA или до приблизительно 100 RU в канале потока 2 Series S BiotinCAPture Chip и рекомбинантный белок CD38-his яванского макака иммобилизовали до приблизительно 50–100 RU в канале потока 2 Series S CM5 Sensor Chip, предварительно покрытого антигистидиновым антителом. Fab-фрагменты вводили в кинетику одиночного цикла в различных концентрациях в диапазоне от 7,8 до 2000 нМ в буфер HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин в канале потока 1 и 2 (канал потока 1 использовали в качестве эталона). Диссоциацию отслеживали в течение 5 мин. После каждого цикла поверхность Series S Sensor Chip SA, покрытую биотинилированным рекомбинантным белком CD38 человека, регенерировали с 60 мкл 10 мМ глицина pH 1,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100354), в то время как поверхности Series S BiotinCAPture Chip и Series S CM5 Sensor Chip, покрытых антигистидиновым антителом, регенерировали с использованием регенерирующего раствора, поставляемого с набором BiotinCAPture (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28920234) и набором His Capture (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28995056) соответственно. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием ленгмюровской модели аппроксимации кинетической функции 1:1. Измерения включали образцы нулевой концентрации для сравнения. Хи-квадрат, U- и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

Эпитоп-специфическая сортировка

Эпитоп-специфическую сортировку Fab-фрагментов в CD38 человека оценивали с использованием интерферометрии биослоя (BLI). Измерения проводили на приборе OctetRED96e (ForteBio) и анализировали с использованием программного обеспечения Data Analysis HT версии 11.1 (Octet, ForteBio). Биотинилированный белок CD38-avi-his человека (Acbsystems, № кат.: CD8-H82E7) загружали при 1 мкг/мл в кинетическом буфере (ForteBio, № кат.: 18-1105) на стрептавидиновый биосенсор SA (ForteBio, № кат.: 15-5019) на 5 мин. Стрептавидиновый биосенсор, покрытый биотинилированным антигеном CD38 человека, погружали в раствор 200 мкМ Fab 1 (насыщающий Fab) на 10 мин с последующим последовательным погружением в смешанный раствор 200 нМ Fab 1 и 200 нМ Fab 2 (конкурирующий Fab) на 5 мин. Все стадии проводили при 25 °С и встряхивании при 1000 об/мин. Свежие стрептавидиновые биосенсоры покрывали биотинилированным CD38 человека перед каждым циклом.

Результаты и выводы

Клоны ScFv, демонстрирующие специфическое связывание с обоими из рекомбинантного белка CD38 человека и рекомбинантного белка CD38 яванского макака по результатам SPR, а также специфическое связывание с клетками CHO CD38 человека, секвенировали и уникальные последовательности, демонстрирующие наилучшие профили связывания по результатам SPR, реформатировали в Fab-фрагмент для измерения аффинности связывания.

Аффинности связывания Fab с CD38

- Как было определено методом SPR, тридцать пять клонов Fab продемонстрировали аффинности связывания с рекомбинантными белками CD38 человека и яванского макака с равновесной константой диссоциации (KD) ниже 10 мкл. Клон анти-CD38-UCP01-E2, далее также называемый анти-CD38-E2 (SEQ ID NO: 28 тяжелой цепи), продемонстрировал аффинности к CD38 человека и CD38 яванского макака на уровне 110 нМ и 89 нМ соответственно. Клон анти-CD38-UCP03-B6, далее также называемый анти-CD38-B6 (SEQ ID NO: 43 тяжелой цепи), продемонстрировал аффинности к CD38 человека и CD38 яванского макака на уровне 225 нМ и 829 нМ соответственно. Идентификационные номера последовательности тяжелой цепи и аффинности связывания указанных клонов представлены в таблице 2.
- 10 Таблица 2. Общий обзор сконструированных клонов Fab и их относительная аффинность к CD38 человека и яванского макака. НС = нет детектируемого связывания; Н/И = не исследовали.

Название клона	SEQ ID NO тяжелой цепи клона	KD CD38 человека (нМ)	KD CD38 яванского макака (нМ)
Fab анти-CD38-UCP01-B1	SEQ ID NO: 22	193	102
Fab анти-CD38-UCP01-D1	SEQ ID NO: 23	666	НС
Fab анти-CD38-UCP01-F1	SEQ ID NO: 24	429	393
Fab анти-CD38-UCP01-G1	SEQ ID NO: 25	1124	283
Fab анти-CD38-UCP01-H1	SEQ ID NO: 26	437	352
Fab анти-CD38-UCP01-C2	SEQ ID NO: 27	85,3	53,5
Fab анти-CD38-UCP01-E2	SEQ ID NO: 28	110	88,9
Fab анти-CD38-UCP02-A7	SEQ ID NO: 29	71,14	слабое связывание
Fab анти-CD38-UCP02-B1	SEQ ID NO: 30	595	слабое связывание
Fab анти-CD38-UCP02-B7	SEQ ID NO: 31	1709	Н/И
Fab анти-CD38-UCP02-C3	SEQ ID NO: 32	305,1	187,7
Fab анти-CD38-UCP02-D1	SEQ ID NO: 33	132,9	78
Fab анти-CD38-UCP02-D5	SEQ ID NO: 34	192	33,5
Fab анти-CD38-UCP02-E5	SEQ ID NO: 35	0,03	слабое связывание
Fab анти-CD38-UCP02-F2	SEQ ID NO: 36	14,16	13,96
Fab анти-CD38-UCP02-F5	SEQ ID NO: 37	71,08	55,22
Fab анти-CD38-UCP02-F6	SEQ ID NO: 38	389,2	слабое связывание
Fab анти-CD38-UCP02-H1	SEQ ID NO: 39	153,9	2,7
Fab анти-CD38-UCP03-B3	SEQ ID NO: 40	115	170
Fab анти-CD38-UCP03-B3	SEQ ID NO: 41	117	465
Fab анти-CD38-UCP03-H5	SEQ ID NO: 42	141,6	111

Fab анти-CD38-UCP03-B6	SEQ ID NO: 43	225	829
Fab анти-CD38-UCP03-E3	SEQ ID NO: 44	300	195
Fab анти-CD38-UCP03-A6	SEQ ID NO: 45	410	525
Fab анти-CD38-UCP03-B1	SEQ ID NO: 46	882	462
Fab анти-CD38-UCP03-C2	SEQ ID NO: 47	1388	628
Fab анти-CD38-UCP03-H2	SEQ ID NO: 48	1850	672
Fab анти-CD38-UCP03-H3	SEQ ID NO: 49	810	178

Эпитоп-специфическая сортировка

Для оценки конкуренции с клонами анти-CD38 в CD38 проводили анализ эпитоп-специфической сортировки с использованием Fab-фрагментов анти-CD38 и рекомбинантного белка CD38 человека методом интерферометрии биослоя Octet. На Фиг. 2 показано, что клоны анти-CD38-E2 и анти-CD38-B6 не конкурируют друг с другом и, таким образом, не распознают частично совпадающие эпитопы на CD38.

Пример 3. Оптимизация анти-CD38-E2 и анти-CD38-B6

Материал и методы

Рекомбинантные целевые антигены

Рекомбинантный белок CD38-ECD-C-his человека (SEQ ID NO: 1), далее также называемый рекомбинантным белком CD38 человека, и рекомбинантный белок CD38-ECD-C-his яванского макака (SEQ ID NO: 2), далее также называемый рекомбинантным белком CD38 яванского макака, были получены в рамках собственной разработки, как описано в примере 2.

Генерирование и выбор библиотеки

Были сгенерированы пять библиотек созревания аффинности для обоих из клонов анти-CD38-E2 (SEQ ID NO: 28) и анти-CD38-B6 (SEQ ID NO: 43) посредством диверсификации тяжелой цепи CDR. CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 были рандомизированы с использованием олигонуклеотидов вырожденного кодона NNK (причем N представляет собой любой из четырех дезоксирибонуклеотидов и K представляет собой G или T) в остатках по Кабату 27–35, 50–58, 95–101 минус 2 соответственно. Каждую библиотеку генерировали с использованием пула перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих 5 последовательных вырожденных кодонов. CDR-H1 и CDR-H2 также были диверсифицированы с использованием тримерного олигонуклеотида в положении по Кабату 27–35 и 50–58 соответственно. Полученные пять продуктов ПЦР библиотеки клонировали в рNGLEN (модифицированный в рамках собственной разработки фагмидный вектор рUC119) и полученную в результате реакцию лигирования электропорировали в клетки TG1 E. coli. Трансформированные клетки распределяли на планшетах 2YTAG и инкубировали ТН при 30 °С. Колонии собирали с планшетов в 10 мл среды 2YT и добавляли 15% глицерина (конечная

концентрация) для хранения при -80 °С. Фаги получали и очищали в две стадии осаждения с одной третьей об./об. 20% PEG-6000, 2,5 М NaCl и ресуспендировали в PBS.

Выбор фагового дисплея проводили с использованием рекомбинантных белков, как описано в примере 1, со следующими модификациями. Отсеянный фаг инкубировали с 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ биотинилированного рекомбинантного белка CD38 человека (Acbiosystems, № кат.: CD8-H82E7) для раунда 1, раунда 2 и раунда 3 соответственно. После 1 ч инкубирования 1 мкМ рекомбинантного белка CD38 человека, полученного в рамках собственной разработки (небиотинилированного, SEQ ID NO: 1), добавляли на 3 ч при КТ во время раундов 2 и 3.

Скрининг аффинности методом SPR

Анализ методом SPR использовали для подтверждения специфической связывающей активности новых клонов scFv и ранжирования положительных клонов в соответствии с их профилем связывания. Измерения проводили, как описано в примере 2, со следующими модификациями. Измерения проводили на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °С и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (v3.1). Доступный в продаже рекомбинантный белок CD38 человека (Acbiosystems, № кат.: CD8-H224) разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100350) и затем иммобилизовали в канале потока 2 до уровня приблизительно 1300 RU на Series S CM5 sensor CHIP (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100530) с использованием набора для связывания по аминокислоте (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100050). Фильтрованные периплазматические экстракты вводили непосредственно в CM5 Sensor Chip с ковалентно связанным CD38 человека в каналы потока 1 и 2 (канал потока 1 использовали в качестве эталона). Диссоциацию в буфере HBS-EP+ отслеживали в течение 10 мин. Клоны scFv, демонстрирующие наилучшие профили связывания, реформатировали в Fab-фрагменты, как описано в примере 1.

Аффинности связывания Fab с CD3

Оценку аффинностей Fab к CD38 человека с использованием Fab в качестве аналита проводили на Series S BiotinCAPture Chips (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28920234) с использованием доступного в продаже рекомбинантного биотинилированного CD38 человека Avitag™ His Tag (Acbiosystems, № кат.: CD8-H82E7), как описано в примере 2, с концентрациями ввода Fab в диапазоне от 1,95 нМ до 500 нМ. Измерения для CD38 яванского макака с использованием Fab в качестве аналита проводили на Series S CM5 Sensor Chips (Biacore, GE Healthcare, №.кат.: BR100530), предварительно иммобилизованных с антигистидиновым антителом (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28995056), с использованием рекомбинантного белка CD38-ECD-C-his яванского макака, полученного в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 2), как описано в примере 2, с концентрациями ввода Fab в диапазоне от 1,48 нМ до 120 нМ.

Аффинности Fab к CD38 человека и яванского макака с использованием Fab в качестве лиганда измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °С и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (v3.1). Измерения проводили на Series S CM5 Sensor Chips (Biacore T200, Biacore, GE Healthcare, № кат.:

BR100530) с нанесенными антителами к Fab человека с использованием коммерческого набора (Human Fab Capture Kit, Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28958325). Измерения методом SPR проводили с рекомбинантным белком CD38 человека или рекомбинантным белком CD38 яванского макака, полученными в рамках собственной разработки (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно). Аффинности к CD38 человека и яванского макака оценивали путем иммобилизации Fab-фрагментов и использования белка CD38 человека или яванского макака в качестве аналита. Приблизительно 50–200 RU Fab захватывали в канале потока 2 Series S CM5 Sensor Chip с нанесенными антителами к Fab человека. CD38 человека или яванского макака вводили в кинетику нескольких циклов в различных концентрациях в диапазоне от 0,2 до 100 нМ в буфер HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, № кат.: BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 5 мин в канале потока 1 и 2 (канал потока 1 использовали в качестве эталона). Диссоциацию отслеживали в течение 10 мин. После каждого цикла поверхность регенерировали 60 мкл регенерационного раствора, поставляемого с Human Fab Capture Kit (Biacore, GE Healthcare, № кат.: 28958325). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием ленгмюровской модели аппроксимации кинетической функции 1 : 1. Измерения включали образцы нулевой концентрации для сравнения. Хи-квадрат, U- и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

15 Результаты и выводы

Созревание аффинности клона анти-CD38-E2 (SEQ ID NO: 28 тяжелой цепи) и клона анти-CD38-B6 (SEQ ID NO: 43 тяжелой цепи) включало в себя диверсификацию CDR-H1 (позиции по Кабату 27–35), CDR-H2 (позиции по Кабату 50–58) и CDR-H3 (позиции по Кабату 95–101 минус 2) в пяти отдельных библиотеках. Выделяли клоны ScFv с более медленной скоростью диссоциации, чем у их соответствующего родительского клона (анти-CD38-E2 или анти-CD38-B6), по результатам измерений методом SPR. Клоны ScFv реформатировали и экспрессировали как Fab-фрагменты и аффинности к CD38 человека и яванского макака измеряли методом SPR. По результатам этой оценки выбранные мутации, полученные из библиотек CDR-H1 и CDR-H2, объединяли для дальнейшего улучшения скорости диссоциации; один клон, называемый клоном Fab анти-CD38-E2-RecA (SEQ ID NO: 57), имел наиболее высокие аффинности к CD38 человека и яванского макака с измеренными KD на уровне 0,9 нМ и 3,7 нМ соответственно при использовании Fab в качестве лиганда. Клоны анти-CD38-E2-UCP02-F3 (SEQ ID NO: 52), далее также называемые анти-CD38-E2-F3, и анти-CD38-E2-UCP02-F8 (SEQ ID NO: 55), далее также называемые анти-CD38-E2-F8, продемонстрировали аффинности к CD38 человека на уровне 3,5 нМ и 17,6 нМ соответственно и к CD38 яванского макака на уровне 2,4 нМ и 24,5 нМ соответственно при измерениях с использованием Fab в качестве аналита. Один клон, называемый клоном Fab анти-CD38-B6-D9 (SEQ ID NO: 61), продемонстрировал наибольшее повышение аффинности к CD38 человека и яванского макака по результатам созревания аффинности анти-CD38-B6 с измеренными KD на уровне 2,3 нМ и 5,2 нМ соответственно при использовании Fab в качестве лиганда и на уровне 0,55 и 3,3 нМ соответственно при использовании Fab в качестве аналита. Идентификационные номера последовательности тяжелой цепи и аффинность связывания указанных клонов с CD38 человека и яванского макака представлены в таблице 3.

Таблица 3. Общий обзор сконструированных клонов Fab и их относительная аффинность к CD38 человека и яванского макака, измеренные с Fab в качестве анализита и с Fab в качестве лиганда. НС = нет детектируемого связывания; Н/И = не исследовали.

Библиотека	Название клона	SEQ ID NO тяжелой цепи клона	KD CD38 человека (нМ), Fab в качестве анализита	KD CD38 яванского макака (нМ), Fab в качестве анализита	KD CD38 человека (нМ), Fab в качестве лиганда	KD CD38 яванского макака (нМ), Fab в качестве лиганда
CDR-H1	FAB анти-CD38-E2-UCP01-A10	SEQ ID NO: 50	9,4	8,6	16,89	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-E7	SEQ ID NO: 51	2,2	1,88	4,66	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-F3	SEQ ID NO: 52	3,5	2,4	6,13	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-D6	SEQ ID NO: 53	4,9	1,1	5,35	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-G8	SEQ ID NO: 54	5,2	4,2	77	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-F8	SEQ ID NO: 55	17,6	24,5	16,22	Н/И
CDR-H2	FAB анти-CD38-E2-UCP02-A5	SEQ ID NO: 56	23,6	4,4	35,03	Н/И
Комбинация	FAB анти-CD38-420-E2-RecA	SEQ ID NO: 57	Н/И	Н/И	0,9	3,7
Комбинация	FAB анти-CD38-420-E2-RecB	SEQ ID NO: 58	Н/И	Н/И	1,6	4,4
Комбинация	FAB анти-CD38-420-E2-RecC	SEQ ID NO: 59	Н/И	Н/И	1,3	3,9
Комбинация	FAB анти-CD38-420-E2-RecD	SEQ ID NO: 60	Н/И	Н/И	6,7	22,1
CDR-H1	FAB анти-CD38-B6-MP01-D9	SEQ ID NO: 61	0,55	3,33	2,3	5,2
CDR-H1	FAB анти-CD38-B6-MP01-B4	SEQ ID NO: 62	11,9	45,4	516	167
CDR-H1	FAB анти-CD38-B6-MP02-C1	SEQ ID NO: 63	12	67,2	97,7	333

CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP02-B10	SEQ ID NO: 64	20,1	81,2	108	528
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP01-H3a	SEQ ID NO: 65	28,3	120	89,4	389
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP01-H3b	SEQ ID NO: 66	28,9	130	171	330
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP01-A4	SEQ ID NO: 67	84,9	229	227	828
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP01-C2	SEQ ID NO: 68	209	Н/И	345	Н/И
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP02-C2	SEQ ID NO: 69	101	Н/И	404	342
CDR-H1	FAB анти-CD38- B6-MP02-G11	SEQ ID NO: 70	425	262	128	534

Пример 4. Конструирование биспецифических антител CD38/CD47

Материал и методы

Конструирование экспрессионных векторов для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих

- 5 кДНК, частично или полностью кодирующие различные полипептидные цепи, были первым геном, синтезированным Twist Biosciences (г. Сан-Франциско, США) и модифицированным с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Продукты ПЦР вводили в модифицированную плазмиду pcDNA3.1 (Invitrogen AG, г. Цуг, Швейцария), несущую промотор CMV и сигнал полиаденилирования гена гормона роста быка (poly(A)), с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Все полипептидные цепи независимо клонировали в
10 экспрессионный вектор, в котором секреция стимулировалась мышинным лидерным пептидом легкой цепи IgGκ.

Экспрессия антител в клетках HEK-293-EBNA

- Если не указано иное, биспецифические антитела BEAT и контрольные антитела экспрессировали следующим образом. Для транзientной экспрессии равные количества каждой сконструированной векторной цепи совместно трансфицировали в суспензионно-адаптированные клетки HEK293-EBNA (стандарты ATCC-LGL, г. Теддингтон, Великобритания; № кат. CRL-10852) с использованием полиэтиленимина (PEI; Polysciences). Как правило, клетки
15 готовили при 8 миллионах клеток на мл в RPMI1640 (Biowest) с добавлением 0,1% Pluronic F-68 (Gibco). Затем клетки трансфицировали со смесью ДНК-PEI при 37 °C. Через 4 часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 с добавлением фенолового красного или BalanCD HEK293 (Irvine Scientific) и 4 mM L-глутамина и инкубировали в течение 5 дней с орбитальным встряхиванием при 37 °C, 5% CO₂ и 80% влажности. Бесклеточные

супернатанты культуры, содержащие рекомбинантные белки, готовили путем центрифугирования с последующей фильтрацией и использовали для дальнейшей очистки.

Очистка биспецифических антител BEAT CD38/CD47 дифференциальной аффинной хроматографией с белком А

Супернатанты из НЕК293-EBNA необязательно кондиционировали с 0,1 объема (V) 1 М фосфата натрия, pH 6,0 перед
 5 очисткой или использовали непосредственно без кондиционирования. К кондиционированным супернатантам добавляли смолу KanCapA (KANЕКА, Бельгия). Смеси инкубировали в течение ночи при 4 °С с перемешиванием. После инкубирования связанные белки промывали с 10 объемами колонки (CV) PBS pH 7,4 с последующими 2 CV 170 мМ ацетата натрия, pH 5,0, затем элюировали в несколько стадий 50 мМ ацетата натрия, pH 4,3, 4,1 и/или pH 3,9 и
 10 нейтрализовали с 0,1 V 1 М Tris-HCl pH 8,0. Фракции элюирования диализовали в PBS, pH 7,4, фильтровали в стерильных условиях и анализировали эксклюзионной ВЭЖХ (TSK gel G3000SWXL, 5 мкм, 7,8 мм × 30 см длиной, частицы 5 мкм и поры 250 Å (№ кат. 08541, TOSOH BIOSCIENCE) при комнатной температуре с 0,1 М буфера фосфата натрия, 0,15 М хлорида натрия, pH 6,8 в качестве элюента при скорости потока 1 мл/мин на HPLC Alliance 2695 (Waters) или Acquity Arc HPLC (Waters) с нагревателем колонки и либо детектором UV/Vis (2487 или 2489, производства Waters), либо детектором PDA (2996 или 2998, производства Waters) и SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris 4–12% акриламид,
 15 Invitrogen AG, г. Базель, Швейцария). Многокассетную систему Endosafe-MCS от Charles River с применением анализа на основе лизата амебоцитов мечехвоста (LAL) для подтверждения уровня бактериального эндотоксина ниже 5 ЭЕ/мг. Как правило, для очищенных антител содержание агрегированных форм было ниже 5%, а монодисперсность по результатам эксклюзионной ВЭЖХ была выше 95%. Образцы дополнительно анализировали на предмет уровней гетеродимеризации методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ОФ-ВЭЖХ-МС), как описано ниже.
 20

Определение уровня гетеродимеризации методом ОФ-ВЭЖХ-МС

Образцы дегликозилировали в течение ночи с PNGase F. ОФ-ВЭЖХ-МС проводили на хроматографической системе Vanquish (ThermoFisher Scientific), соединенной с квадрупольным масс-спектрометром с гибридным электрораспылением с расширенным диапазоном масс Orbitrap (QExactive Plus BioPharma, ThermoFisher Scientific).
 25 Очищенные белки вводили в полифенильную колонку с обращенной фазой (колонка Bio BioResolve RP mAb 2,1 × 150 мм 450 Å, 2,7 мкм, Waters, Великобритания). Температура колонки устанавливалась на уровне 70 °С. Подвижная фаза состояла из 0,08% муравьиной кислоты и 0,02% трифторуксусной кислоты в воде (растворитель А) и 0,08% муравьиной кислоты и 0,02% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (растворитель В). Белки загружали в 5% растворитель В со скоростью потока 0,4 мл/мин. Элюирование проводили с линейным градиентом растворителя В от 30% до 38%. Масс-спектрометр использовали в режиме сканирования с определением положительно заряженных ионов с диапазоном значений масса/заряд 1500–5000 с разрешением 17500 при значении масса/заряд 200. Энергия соударений на источнике устанавливалась на уровне 60 эВ, чтобы избежать формирования аддуктов TFA. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения BioPharma Finder (ThermoFisher Scientific).
 30 Регистрация пика проводилась с использованием скользящего окна с деконволюцией с использованием алгоритма ReSpect®. Идентификации проводили посредством сравнения измеренных масс со значениями, рассчитанными для

различных ожидаемых соединений. Чистоту оценивали посредством интеграции площадей экстрагированных ионных хроматограмм для обнаруженных белковых соединений.

Результаты и вывод

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD38 и CD47, конструировали с использованием технологии гетеродимеризации тяжелой цепи (Hc) BEAT®, описанной ранее (Skegto *et al.*, (2017) *J Biol Chem* 292(23): 9745–9759 и Stutz *et al.*, (2020) *J Biol Chem* 295(28): 9392–9408); такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы называются в настоящем документе BEAT CD38/CD47. Участок анти-CD38 молекулы CD38/CD47 может использоваться для направленного воздействия на опухолевые клетки, которые экспрессируют CD38, а участок анти-CD47 биспецифической молекулы может использоваться для блокирования сигнала ингибирования опосредованного CD47 фагоцитоза, который приводится в действие при взаимодействии CD47 с SIRP α (сигнальным регуляторным белком α) на иммунных клетках (в основном макрофагах, Willingham *et al.*, (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109(17): 6662–6667). Взаимодействие SIRP α с его лигандом, CD47, широко экспрессируемым трансмембранным белком, передает сигнал «не ешь меня» посредством инициирования сигнальных каскадов, которые в конечном итоге ингибируют фагоцитоз. Наличие такого сигнала ингибирования позволяет раковым клеткам частично обходить опосредованные макрофагами механизмы контроля иммунной системы. CD47 экспрессируется на большинстве типов клеток, и, таким образом, для предотвращения связывания клеток, экспрессирующих CD47, которые не экспрессируют CD38, была сочтена подходящей слабая аффинность к CD47, т. е. создание возможности для домена анти-CD38 определять связывание с клетками-мишенями, что затем обуславливает связывание проксимального рецептора CD47 на той же клетке за счет avidности. Важно отметить, что CD47 экспрессируется на эритроцитах (RBC) и тромбоцитах, которые экспрессируют CD38. Важнейшую роль в целевой специфичности биспецифического антитела играет подавление поперечного связывания эритроцитов, а также тромбоцитов за счет образования мостиков CD47 и CD38, которые будут индуцироваться конструктором биспецифического антитела с двумя высокоаффинными связывающими плечами. Мы предусматриваем низкую аффинность связывающего плеча CD47, чтобы свести к минимуму связывание с клетками, экспрессирующими CD47, которые не экспрессируют CD38, и избежать гемагглютинации и агрегации тромбоцитов, но эффективно блокировать взаимодействие CD47-SIRP α . Блокирование CD47 в сочетании с высокой специфичностью к CD38 будет, таким образом, позволять блокировать опосредованное CD47 ингибирование фагоцитоза специфичным образом для раковых клеток, экспрессирующих CD38. В результате клетки-мишени будут восприимчивы к антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP). Дополнительные эффекторные механизмы, т. е. антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), будут вносить вклад в механизм действия.

Биспецифические антитела, содержащие анти-CD38-специфический связывающий домен и анти-CD47-специфический связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методик, причем антигенсвязывающий домен анти-CD38 и антигенсвязывающий домен анти-CD47 в каждом случае содержат отдельные отличные друг от друга вариабельные области (VH) Hc, соединенные общей легкой цепью (cLc) (Фиг. 3). cLc позволяет избежать любого возможного нарушения комплементарности в легкой цепи, которое часто наблюдается

при включении двух различных доменов VH, а также двух различных когнатных легких цепей в биспецифическое антитело. Биспецифические антитела, содержащие гетеродимерную область Fc BEAT (SEQ ID NO: 257 и 258) и Hc, были сконструированы с различной авидностью к белку А (РА), что позволяет разделять гомо- и гетеродимерные соединения, как сообщалось ранее (Skegjo *et al.*, (2017) *supra* и Ollier *et al.*, (2019) MAb 11(8): 1464–1478). Более конкретно, плечо анти-CD47 гетеродимерного иммуноглобулина содержало Hc BEAT(A), включающую в себя VH с мутацией G65S (нумерация по Кабату), выбранную из таблицы 1 (анти-CD47-H2), область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 и домен CH3 BEAT(A) на основе γ 3, собранный с cLc (SEQ ID NO: 10). Эта Hc включала в себя часть области Fc человеческого IgG3 и, следовательно, не обладала связыванием с РА. Вместе с тем, поскольку Hc, используемая в настоящем документе, содержала свой домен VH из подкласса VH3, домен VH мутировали для включения в него замены G65S, тем самым удаляя любые дополнительные сайты связывания РА внутри Hc (Ollier *et al.*, (2019) *supra*). Важно отметить, что был разработан и протестирован ряд не представленных здесь дополнительных конструкторов с альтернативными доменами VH анти-CD47 с различными аффинностями, после чего анти-CD47-H2 был сочтен наиболее подходящим. Плечо анти-CD38 гетеродимерного иммуноглобулина содержало Hc BEAT(B), включающую в себя домен VH, выбранный из таблицы 3 (анти-CD38-E2-F3, анти-CD38-E2-F8 или анти-CD38-E2-ResA), область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 и домен CH3 BEAT(B) на основе γ 1, собранный с cLc. Биспецифические антитела, полученные в результате сборки Hc BEAT(A) и BEAT(B), а также cLc упоминаются в настоящем документе как BEAT CD38/CD47-X, где X представляет собой номер конструктора, состоящего из конкретного набора переменных доменов (таблица 4). Биспецифические антитела транзистентно экспрессировали в НЕК и очищали с помощью дифференциальной хроматографии с РА. Для всех антител регистрировали монодисперсность > 95% по данным эксклюзионной ВЭЖХ при < 1% гомодимерных примесей, как определено по результатам ОФ-ВЭЖХ-МС. Уровни эндотоксина были ниже 5 ЭЕ/мг. Биспецифические антитела BEAT CD38/CD47 дополнительно тестировали на биологическую активность (см. ниже).

Таблица 4. Перечень конструкторов биспецифических антител BEAT CD38/CD47 с их соответствующими SEQ ID NO.

Конструктор	Hc BEAT(A)	Hc BEAT(B)	cLc
BEAT CD38/CD47–3	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–6	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–19	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 262	SEQ ID NO: 10

25 Пример 5. Конструирование антител с повышенной эффекторной функцией

Материал и методы

Клонирование, экспрессия и очистка

Биспецифические антитела продуцировали в клетках НЕК293-EBNA, как описано выше. BEAT CD38/CD47–60, а также –42 и –48, использовавшиеся для анализов, представленных на Фиг. 9 и далее, экспрессировали в клетках CHO-

- S. Векторы со сконструированной цепочкой и вектор, кодирующий ядерный антиген-1 вируса Эпштейна — Барр (EBV) (EBNA-1), совместно трансфицировали в клетки CHO-S (приготовленные в соответствии с действующей НПП, Invitrogen, № кат. A1136401) с использованием полиэтиленимина (PEI; Polysciences). Как правило, клетки готовили при 8 миллионах клеток на мл в среде CD-CHO (Gibco). Затем клетки трансфицировали со смесью ДНК-PEI при 37 °С.
- 5 Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в PowerCHO™ 2 (Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамина и инкубировали в течение 14 дней с орбитальным встряхиванием при 32 °С, 5% CO₂ и 80% влажности. Очищенные супернатанты клеточной культуры, содержащие рекомбинантные белки, готовили путем центрифугирования с последующей фильтрацией. Очистку биспецифических антител BEAT CD38/CD47 из супернатанта проводили с помощью дифференциальной хроматографии с РА, как описано выше.
- 10 Контрольное IgG1 антитело трастузумаб (SEQ ID NO: 263 и 264) экспрессировали в НЕК293-EBNA или CHO-S, как описано выше, и очищали следующим образом: очищенные супернатанты клеточной культуры, содержащие рекомбинантные белки, готовили путем центрифугирования с последующей фильтрацией. Супернатанты использовали непосредственно без кондиционирования. К супернатанту добавляли смолу CaptivA (Repligen, г. Уолтэм, США) и инкубировали в течение ночи при 4 °С с постоянным перемешиванием. После инкубирования связанный
- 15 белок промывали с 10 объемами колонки (CV) PBS pH 7,4 с последующими дополнительными 10 CV PBS pH 7,4. Затем белок элюировали в несколько стадий 4 CV 100 мМ глицина, pH 3,0 и нейтрализовали 0,1 V 1 M Tris-HCl pH 8,0.

- Для экспрессии изотипического контрольного антитела (ABC IgG1, SEQ ID No: 265 и 266) равные количества каждого из векторов со сконструированной цепочкой и векторов, кодирующих усиленные гены зеленого флуоресцентного белка (eGFP) и гены резистентности к пуромицин-N-ацетилтрансферазе (PAC) и неомицину, были совместно
- 20 трансфицированы в клетки CHO-S (приготовленные в соответствии с действующей НПП, Invitrogen, № кат. A1136401) с использованием линейного полиэтиленимина (PEI) в среде Opti-MEM (ThermoFisher). Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в среде PowerCHO 2 CD (Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамина. На следующий день клетки разбавляли до 2×10^6 клеток/мл и субклонировали с использованием ограниченного разбавления (от 1 : 10 до 1 : 50) в 96-луночных планшетах (100 мкл на лунку) в среде PowerCHO2 с 4 мМ L-глутамина
- 25 с добавлением пуромицина (5 мкг/мл) и генетицина (200 мкг/мл). Давление отбора возобновляли через одну неделю посредством добавления 100 мкл среды PowerCHO2 с 4 мМ L- глутамина и пуромицином. Выбор стабильного клона проводили через 14 дней после трансфекции и на основании интенсивности сигнала eGFP, оцениваемого с помощью проточной цитометрии. Клоны с наибольшей экспрессией eGFP амплифицировали. Стабильные линии клеток CHO, экспрессирующие антитело ABC IgG1, субкультивировали в среде PowerCHO2 с добавлением 4 мМ L-глутамина,
- 30 5 мкг/мл пуромицина и 200 мкг/мл генетицина в биореакторах TubeSpin (TPP) с орбитальным встряхиванием при 200 об/мин при 37 °С, 5% CO₂ и 80% влажности. Очистку проводили аналогично описанной выше для контрольного антитела IgG1 трастузумаба.

- Шарнирно-стабилизированное антитело 5F9 IgG4, упоминаемое далее как 5F9-G4 (SEQ ID NO: 267 и 268), экспрессировали в НЕК293-EBNA, как описано выше, и очищали следующим образом: очищенные супернатанты
- 35 клеточных культур, содержащие рекомбинантные белки, готовили путем центрифугирования с последующей

фильтрацией. К супернатанту добавляли смолу KANEKA KanCapA™ (Kaneka) и инкубировали в течение ночи при 4 °С с постоянным перемешиванием. После инкубирования связанный белок промывали с 1× PBS, pH 7,4 (1 × 10 CV) и элюировали с использованием протокола постадийного элюирования с использованием последовательно 50 мМ ацетата натрия, pH 4,3, pH 4,1, pH 3,9 и 0,1 М глицина, pH 3,5.

- 5 Все очищенные образцы анализировали посредством SDS-PAGE, SE-HPLC и необязательно RP-HPLC-MS, как описано выше.

Рекомбинантный гибридный белок внеклеточного домена человеческого неонатального рецептора Fc (FcRn) с Avitag™-полигистидиновой меткой

- 10 Растворимые внеклеточные области человеческого FcRn (№ доступа Uniprot: P55899; остатки 24–297; SEQ ID NO: 269) и полноразмерный бета-2-микроглобулин (82171; № доступа Uniprot: P61769, остатки 1–119; SEQ ID NO: 270) клонировали, как описано выше. В2М клонировали без какой-либо метки и FcRn клонировали для получения белка с С-концевым Avitag™ (Avidity LLC) с последующим добавлением метки 10-His с линкерной последовательностью gly₃ между двумя метками (сокращенно SIRPα-ECD-Avi-His человека). Экспрессионный вектор, кодирующий человеческий FcRn, являлся носителем мышинного лидерного пептида VJ2C для стимуляции секреции продукта, а также последовательности ОпР. Экспрессионный вектор, кодирующий человеческий В2М, являлся носителем нативного лидерного пептида В2М. Для экспрессии комплекса человеческого FcRn/В2М плазмиды, кодирующие FcRn-ECD-Avi-His и В2М человека, совместно трансфицировали в суспензионно-адаптированные клетки HEK293-EBNA, как описано выше. После экспрессии в очищенный супернатант добавляли гранулы Ni-Sephарose Excell (GE Healthcare) и инкубировали в течение ночи при 4 °С с осторожным перемешиванием. Затем смеси загружали в колонки Econo-
20 Columns (Bio-Rad Laboratories) для очистки самотеком. Гранулы сначала промывали в 1×PBS, 20 мМ имидазола, pH 7,4 (10 CV), затем 1×PBS с добавлением 40 мМ имидазола, pH 7,4 (10 CV) и элюировали белок с использованием 1×PBS с добавлением 250 мМ имидазола (1 × 1 CV и 5 × 2 CV). Замену буфера на 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 6,0 проводили на колонках PD-10 (GE). Качество белка оценивали по SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ, измерению эндотоксина, как описано выше. Помеченный гибридный белок FcRn-ECD-Avi-His человека, как описано в настоящем
25 документе, имеет SEQ ID NO: 269.

Рекомбинантный гибридный белок внеклеточного домена человеческих рецепторов Fcγ (FcγRs) с полигистидиновой меткой

- 30 Внеклеточные области FcγR2a (№ доступа UniProt: P12318, остатки 34–208), FcγR2b (№ доступа UniProt: P31994, остатки 46–217) и FcγR3a (№ доступа Uniprot: P08637, остатки 17–193) клонировали, как описано выше. Экспрессионный вектор включал последовательность Козака и стартовый кодон с последующим добавлением мышинного лидерного пептида легкой цепи IgGx на 5'-конце и 6 или 10-His-метки на 3'-конце его сайта множественного клонирования. Растворимые внеклеточные области FcγR2a, FcγR2b и FcγR3a человека, слитые с 6 или 10-His-меткой, экспрессировали, как описано выше. После экспрессии и сбора в очищенный супернатант добавляли 20 мМ имидазола и перед добавлением смолы доводили pH до 7,4 за исключением FcγR3a-ECD-His. Супернатант инкубировали со

смолой в течение ночи. На следующий день порточную жидкость собирали посредством самотека и смолу промывали с 2×10 СТ $1 \times$ PBS, 20 мМ имидазола, pH 7,4 (Fc γ R2a-ECD-His и Fc γ R2b-ECD-His) или 10 CV $1 \times$ PBS, pH 7,4 с последующей второй стадией промывки с 10 CV $1 \times$ PBS, 20 мМ имидазола, pH 7,4 (для Fc γ R3a-ECD-His). Белок элюировали с 5×1 CV и 2×2 CV $1 \times$ PBS, 500 мМ имидазола, pH 7,4 (Fc γ R2a-ECD-His и Fc γ R2b-ECD-His) или 8×1 CV $1 \times$ PBS, 250 мМ имидазола, pH 7,4 (Fc γ R3a-ECD-His). Затем очищенный белок подвергали диализу с $1 \times$ PBS, pH 7,4. Качество белка оценивали по SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ, измерению эндотоксина, как описано выше. Человеческие помеченные гибридные белки His Fc γ R2a, Fc γ R2b и Fc γ R3a, как описано в настоящем документе, имеют SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 273 соответственно.

Измерения аффинности Fc γ R1a методом SPR

- 10 Анализ SPR использовали для измерения констант скорости ассоциации и диссоциации для кинетики связывания различных биспецифических антител с использованием кинетики одиночного цикла. Кинетику связывания антител измеряли на приборе BIAcore 8K+ (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, г. Глаттбругг, Швейцария) при 25 °C и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (версия 2.0.15.12933, BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH).
- 15 Измерения выполняли на сенсорных чипах Series S CAP (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 28920234) с нанесенным Avi-меченным Fc γ R1a (Acrobiosystems, № кат. FCA-H82E8) с использованием коммерческого Biotin CAPture Kit (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 28920234) до конечного уровня 50–150 RU. Различные разведения биспецифических антител-кандидатов и контрольного IgG1 трастузумаба (0, 1,2, 3,7, 11,1, 33,3, 100 нМ) вводили на сенсорный чип в течение 2 мин при 30 мкл/мин. После десяти минут диссоциации вводили регенерирующий раствор CAP в течение 2 мин со скоростью 10 мкл/мин для регенерации с последующим двухминутным периодом стабилизации. Данные (сенсорограмма: fc2–fc1) сопоставляли с моделью Ленгмюра 1 : 1 без массообмена с использованием глобальной аппроксимации. Значения времени диссоциации составляли по меньшей мере 600 секунд. Измерения проводились в дубликатах и включали образцы с нулевой концентрацией для сравнения. Как хи-квадрат, так и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными
- 20
- 25 данными и отдельными моделями связывания.

Измерения аффинности Fc γ R1a, IIb и IIIa методом SPR

- Анализ SPR использовали для измерения аффинности в установившемся состоянии для связывания различных биспецифических антител. Аффинность антител в установившемся состоянии измеряли на приборе BIAcore 8K+ (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, г. Глаттбругг, Швейцария) при 25 °C и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (версия 2.0.15.12933, BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH).
- 30

Измерения выполняли на сенсорных чипах Series S protein G (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 29179315). Биспецифические молекулы-кандидаты и контрольный IgG1 трастузумаб захватывали с получением конечного R_{max} приблизительно 80–100 RU.

Различные разведения рецепторов Fc IIa, IIb и IIIa (0, 39, 78, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 нМ) вводили на сенсорный чип в течение 2 минут при скорости потока 30 мкл/мин. Через 2 мин диссоциации вводили следующую концентрацию аналита. Чип регенерировали в конце серии концентраций, вводили 10 мМ глицина, pH 1,5 в течение 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин с последующим периодом стабилизации 2 мин. Данные (сенсорограмма: fc2–fc1) сопоставляли с моделью аффинности в установившемся состоянии с использованием глобальной аппроксимации. Значения времени диссоциации составляли по меньшей мере 120 секунд. Измерения проводились в дубликатах и включали образцы с нулевой концентрацией для сравнения. Как хи-квадрат, так и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

Измерения аффинности FcRn методом SPR

10 Исследование SPR использовали для измерения аффинности в установившемся состоянии для связывания различных биспецифических антител. Аффинность антител в установившемся состоянии измеряли на приборе BIAcore 8K+ (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, г. Глаттбругг, Швейцария) при 25 °C и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (версия 2.0.15.12933, BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH).

15 Измерения выполняли на сенсорных чипах Series S CAP (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 28920234) с нанесенным Avi-меченым FcRn (Acrobiosystems, № кат. FCM-H82W2) с использованием коммерческого Biotin CAPture Kit (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 28920234) до конечного уровня 50–150 RU. Различные разведения биспецифических антител-кандидатов контрольного IgG1 трастузумаба (4, 12, 37, 111, 333 и 1000 нМ) вводили на чип в течение 2 мин при скорости потока 10 мкл/мин. После 2 мин диссоциации чип регенерировали введением HBS-EP+ pH 8,5 с последующим периодом стабилизации 2 мин. Данные (сенсорограмма: fc2–fc1) сопоставляли с моделью аффинности в установившемся состоянии с использованием глобальной аппроксимации. Измерения проводились в дубликатах и включали образцы с нулевой концентрацией для сравнения. Как хи-квадрат, так и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

25 Альтернативно (для BEAT CD38/CD47–60) измерения проводили на сенсорных чипах CM5 (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 29104988) с нанесенной смесью моноклональных антител, которые распознают каппа- и лямбда-подтипы легких цепей Fab человека, с использованием коммерческого набора Human Fab Capture (Cytiva Life Sciences, ранее GE Healthcare Europe GmbH, № кат. 28958325). Молекулы-кандидаты антител и контрольный IgG1 трастузумаб соединяли с получением конечного RU приблизительно 20 RU. Различные разведения FcRn (0, 7,2, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500, 1000 нМ) вводили на чип в течение 3 мин при скорости потока 30 мкл/мин. После 10 мин диссоциации чип регенерировали введением 10 мМ глицина pH 2,0 в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин с последующим периодом стабилизации 1 мин. Данные (сенсорограмма: fc2–fc1) сопоставляли с моделью аффинности в установившемся состоянии с использованием глобальной аппроксимации. Значения времени диссоциации составляли по меньшей мере 600 секунд. Измерения проводились в дубликатах и включали образцы с нулевой концентрацией для сравнения. Как хи-квадрат, так и остаточные значения использовали для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

Клеточная культура

Raji (DSMZ, ACC-319) и Daudi (DSMZ, ACC-78) культивировали в RPMI1640. В клеточную культуральную среду добавляли 10%-ю инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (BioWest, № кат. S1816), L-глутамин (Biowest, № кат. X0550), 1 мМ пирувата натрия (Dutscher, № кат. L064213), 1%-ю заменимую аминокислоту (Gibco, № кат. 11140-035) и 1%-й раствор пенициллина-стрептомицина (Dutscher, № кат. L0022). В среду дополнительно добавляли 1% HEPES (Dutscher, № по кат. L0180-100) для Raji и NCI-H929 и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Gibco, № по кат. 31350-010) для NCI-H929.

Анализ комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC)

Опухолевые клетки метили 5 мкМ кальцеина АМ (ThermoFisher, № по кат. C1430) и наносили на 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением (Corning, № кат. 3474) с возрастающей концентрацией тестового антитела и в присутствии сыворотки человека (Sigma Aldrich, H4522) в течение 4 ч 30 мин. Darzalex, используемый здесь и во всех других анализах ниже, был получен коммерческим путем (конусная перф. 100 мг/5 мл, Janssen). В качестве положительного контроля для максимального уничтожения опухолевых клеток использовали Triton X-100. После завершения анализа клетки центрифугировали при 350 g в течение 5 минут и супернатант клеток переносили в 96-луночный планшет с прозрачным дном. Уничтожение опухолевых клеток измеряли посредством количественного определения кальцеина, высвобожденного в супернатанте, с использованием считывающего устройства для планшетов Synergy. Процентное отношение специфического уничтожения рассчитывали в соответствии с формулой [(высвобождение в условиях исследования – спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение – спонтанное высвобождение)].

Дифференциация макрофагов

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей лейкоцитарной пленки посредством градиента Ficoll. Затем моноциты человека выделяли из PBMC с использованием набора для выделения моноцитов EasySep CD14+ (Stemcell, № кат. 19359). Выделенные моноциты дифференцировали в макрофаги посредством их культивирования в полной среде, содержащей 50 нг/мл M-CSF (Peprotech, № кат. 300-25), в течение 7 дней.

Анализ антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP)

Анализ ADCP, показанный на Фиг. 5 и Фиг. 8, выполняли следующим образом: дифференцированные макрофаги собирали с использованием Detachin (AMSBio, № кат. T00-100). 5×10^4 макрофагов наносили на 96-луночный планшет с плоским дном и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, чтобы позволить макрофагам повторно прикрепиться. После этого 1×10^5 клеток Raji, меченных pHRodo (Sartorius, № кат. 4649), добавляли на планшет, следуя инструкциям производителя (соотношение эффектор : мишень 1 : 2), с 80 нМ тестового антитела. Планшеты переносили в систему анализа клеток IncuCyte (Sartorius), размещенную внутри клеточного инкубатора, при 37 °С в течение 5 ч. Каждые 30 мин делали по два изображения на лунку с использованием объектива 10× со временем получения красного канала,

установленным на 800 мс. Планшеты анализировали с использованием программного обеспечения IncuCyte. Фагоцитоз количественно определяли как площадь под кривой, измеренную для сигнала pHrodo в течение 5 ч.

Оценка фагоцитоза методом автоматизированной высокопроизводительной количественной микроскопии

Анализ ADCP, показанный на Фиг. 9, выполняли следующим образом: $1,5 \times 10^4$ опухолевых клеток, меченных 1 мкг/мл pHrodo Red SE (ThermoFisher, P36600), с 3×10^3 макрофагов, полученных из моноцитов, окрашенных 2,5 мкМ Cell trace violet (ThermoFisher, C34557) (соотношение эффектор : мишень = 5 : 1), наносили на 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning, № кат. 3770). Затем в лунку добавляли возрастающую концентрацию тестового антитела и инкубировали в течение 2 ч 30 мин при 37 °С. Затем фагоцитоз оценивали с использованием платформы для скрининга высокого содержания CellInsightCX5 (ThermoFisher) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа клеток HCS Studio Cell Analysis. Фагоцитоз количественно определяли с использованием анализа на основе изображений как среднее количество ярких опухолевых клеток, окрашенных pHrodo, на 100 клеток trace violet-положительных макрофагов.

Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)

РВМС выделяли из свежей лейкоцитарной пленки посредством градиента Ficoll. Затем NK-клетки очищали с использованием набора для выделения NK-клеток (Miltenyi, № кат. 130-092-657). Затем очищенные NK-клетки инкубировали со 100 ЕД/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (Novartis, № кат. L03AC01) в течение ночи при 37 °С.

В день эксперимента 5×10^4 стимулированных IL-2 NK-клеток наносили на планшет с 1×10^4 опухолевых клеток (соотношение эффектор : мишень = 5 : 1) окрашивали 5 мкМ кальцеина АМ (ThermoFisher, № кат. C1430) в 96-луночных планшетах со сверхнизким прикреплением (Corning, № кат. 3474). Затем в лунку добавляли возрастающую концентрацию тестового антитела и инкубировали в течение 4 ч 30 мин при 37 °С. После завершения анализа клетки центрифугировали при 350 g в течение 5 минут и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем краситель Sytox для мертвых клеток (ThermoFisher, № кат. S11348). Образцы получали с использованием проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с использованием Flowjo (Tree Star). Жизнеспособные опухолевые клетки определяли как положительные для кальцеина АМ и отрицательные для красителя Sytox для мертвых клеток. Уничтожение количественно определяли с использованием формулы: $100 - \frac{[(\text{количество в условиях исследования})/(\text{количество в условиях отсутствия антител})]}$.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)

Термостабильность антител сравнивали с помощью калориметрических измерений. Калориметрические измерения выполняли на дифференциальном сканирующем калориметре VP-DSC или дифференциальном сканирующем калориметре PEAQ-DSC MicroCal (Malvern Instruments, Великобритания). Объем ячейки составлял 0,128 мл, скорость нагревания составляла 1 °С/мин, а избыточное давление поддерживали на уровне 64 p.s.i. (фунтов на квадратный дюйм). Все белковые фрагменты использовали в концентрации 1–2 мг/мл в PBS (pH 7,4). Молярную теплоемкость каждого белка оценивали путем сравнения с дублирующими образцами, содержащими идентичный буфер, из которых

белок был исключен. Парциальные молярные теплоемкости и кривые плавления анализировали с использованием стандартных методик. Термограммы корректировали по исходному уровню и перед дополнительным анализом нормализовали концентрацию с использованием модели, не относящейся к двум состояниям, в программном обеспечении, предоставленном производителем.

5 Форсированная деградация

Антитела разбавляли до 0,5 мг/мл в PBS, фильтровали до стерильности и инкубировали при 40 °С в течение периода от 3 до 14 дней, а затем хранили при -80 °С до анализа. После инкубирования образцы анализировали посредством SDS-PAGE и эксклюзионной ВЭЖХ, как описано выше.

Результаты и вывод

10 Как обсуждалось выше, эффекторная функция имеет решающее значение для механизма действия биспецифических антител BEAT CD38/CD47. Ранее сообщалось, что мутации, введенные в участок Fc, усиливают эффекторную функцию антител (например, Shields *et al.*, (2001) *J Biol Chem* 276(9): 6591–6604, Lazar *et al.*, (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4005–4010). Соответственно, область Fc биспецифических антител BEAT CD38/CD47 дополнительно конструировали с усилением множества механизмов действия, как описано ниже.

15 *Варианты антитела с усиленной комплемент-опосредованной эффекторной функцией и усиленным антителозависимым клеточным фагоцитозом*

Ряд вариантов Fc BEAT создавали с целью усиления CDC, а также ADCP. Взаимодействие участка Fc целевого связанного антитела с C1q, первым субкомпонентом комплемента C1, активирует путь комплемента и в конечном итоге индуцирует CDC. Ранее сообщалось, что несколько комбинаций аминокислотных замен в области связывания C1q домена CH2 антител IgG1 усиливают CDC (WO2011104604). ADCP, наоборот, зависит от взаимодействия Fc антитела с гамма-рецепторами Fc (FcγR) на эффекторных клетках. Они экспрессируются на макрофагах, и FcγRIIa в частности вовлечен в ADCP, при этом FcγRIa и FcγRIIIa вносят меньший, но все же значимый и дополняющий вклад (Richards *et al.*, (2008) *Mol Cancer Ther* 7(8): 2517–2527). Ранее сообщалось, что множество мутаций, введенных в домены CH2 антител IgG, в различной степени увеличивают сродство к FcγR и модулируют опосредованную FcγR эффекторную функцию (Shields *et al.*, (2001) *supra*, Lazar *et al.*, (2006) *supra*).

25 В настоящем документе авторы изобретения стремились ввести комбинацию аминокислотных замен в домены CH2 гетеродимерного Fc BEAT с целью усиления CDC и ADCP, опосредованных биспецифическими антителами BEAT CD38/CD47, совместно с макрофагами, обеспечивающими блокаду CD47-SIRPα.

30 Ранее авторы изобретения сообщали о замене S324N, а также о комбинациях S324N с E269D и S298A со значительным увеличением комплемент-индуцированного лизиса клеток-мишеней посредством антитела IgG1. Примечательно, что замена S298A, как сообщалось, также увеличивает аффинность к FcγRIIIa и, таким образом, может рассматриваться для усиления как CDC, так и ADCP (Shields *et al.*, (2001) *supra*). Важным соображением, которое следует учитывать

- при разработке усиления ADCP в антителах, нацеленных на CD47, является присутствие CD47, а также FcγR1a на клеточной поверхности тромбоцитов. Проблема может заключаться в том, что биспецифические антитела CD38/CD47 с сильно повышенной аффинностью к FcγR1a могут связывать клетки тромбоцитов через Fc и, одновременно взаимодействуя с CD47, потенциально могут индуцировать перекрестное связывание и агрегацию тромбоцитов, что может повлиять на специфичность к мишени. В этом отношении усилия авторов изобретения по конструированию были сосредоточены на повышении аффинности связывания FcγR1a, ограничивая при этом увеличение аффинности к FcγR1a. В совокупности цель состояла в том, чтобы исследовать различные уровни повышения аффинности к различным FcγR совместно с мутациями, усиливающими CDC, с целью поиска оптимального баланса между активностью уничтожения и специфичностью воздействия на мишень. Соответственно, различные комбинации мутаций S324N, E269D и S298A, усиливающих CDC, и мутаций S298A, K334E, K334A, S239D и I332E, модулирующих аффинность FcγR, ввели в BEAT CD38/CD47-19, в результате чего были получены конструкторы –21, –22, –24 и –42 (таблица 5). Замены, как правило, вводили симметрично в обе тяжелые цепи. Однако мутации S239D и I332E вводили асимметрично только в Hc BEAT(A), поскольку их симметричное конструирование упраздняло экспрессию биспецифических антител BEAT.
- Таблица 5. Перечень конструкторов биспецифических антител CD38/CD47 BEAT с мутациями Fc, усиливающими эффекторную функцию, и их соответствующих SEQ ID NO.

Конструктор	Мутации Fc	Hc BEAT(A)	Hc BEAT(B)	cLc
BEAT CD38/CD47–19	Нет	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 262	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–21	BEAT(A): S324N + K334E BEAT(B): S324N + K334E	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–22	BEAT(A): S324N BEAT(B): S324N	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–24	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + K334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + K334A	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–42	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	SEQ ID NO: 280	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 10

- Биспецифические антитела получали и характеризовали, как описано выше. Монодисперсность > 95% регистрировали по данным эксклюзионной ВЭЖХ при < 1% гомодимерных примесей, как определено по результатам ОФ-ВЭЖХ-МС. Уровни эндотоксина были ниже 5 ЭЕ/мл. Их способность опосредовать CDC оценивали в клеточном анализе на клетках Daudi. Все дополнительно сконструированные варианты продемонстрировали более высокую активность CDC по сравнению с BEAT CD38/CD47–19 без усиления, подтверждая, что мутации являются функциональными в контексте

гетеродимерного Fc BEAT, как они были в контексте IgG1 дикого типа (Фиг. 4). Один только S324N (BEAT CD38/CD47–22) опосредовал большую часть прироста CDC. Дополнительные мутации K334E в BEAT CD38/CD47–21 и E269D + S298A + K334A в BEAT CD38/CD47–24 опосредовали минимальный дополнительный прирост по сравнению с S324N отдельно при более низких концентрациях антител. S239D + I332E не опосредовали какого-либо дополнительного прироста CDC по сравнению с S324N отдельно (BEAT CD38/CD47–42).

Затем в клеточном анализе на клетках Raji оценивали способность опосредовать ADCP для биспецифических антител BEAT CD38/CD47. Оценивали дополнительные конструкторы к указанным в таблицах 4 и 5, в которых исследовали дополнительную модуляцию аффинности FcγR (таблица 6). Удаление замены E269D из BEAT CD38/CD47–23 и –24 оценивали в конструкторах BEAT CD38/CD47–25 и –26 с гипотезой о том, что несмотря на пользу E269D для CDC он потенциально мог нарушать взаимодействие с FcγR, как ранее наблюдалось для мутации E269A (Shields *et al.*, (2000) *supra*). Конструкторы получали и характеризовали, как описано выше. Монодисперсность > 95% регистрировали по данным эксклюзионной ВЭЖХ при < 1% гомодимерных примесей, как определено по результатам ОФ-ВЭЖХ-МС. Уровни эндотоксина были ниже 5 ЭЕ/мг.

Таблица 6. Перечень дополнительных конструкторов биспецифических антител CD38/CD47 BEAT с мутациями Fc, усиливающими эффекторную функцию, и их соответствующих SEQ ID NO.

Конструктор	Мутации Fc	Hc BEAT(A)	Hc BEAT(B)	cLc
BEAT CD38/CD47–23	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + E334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + E333A	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–25	BEAT(A): S298A + S324N + E334A BEAT(B): S298A + S324N + E333A	SEQ ID NO: 283	SEQ ID NO: 284	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–26	BEAT(A): S298A + S324N + K334A BEAT(B): S298A + S324N + K334A	SEQ ID NO: 285	SEQ ID NO: 286	SEQ ID NO: 10

Антитела BEAT CD38/CD47–3, –6 и –19 без усиления, все из которых имеют один и тот же VH анти-CD47, показали сходные уровни ADCP независимо от аффинности анти-CD38, которая была самой низкой для конструктора –6 и самой высокой для конструктора –19 (Фиг. 5). Мутация K334E существенно усиливала ADCP для BEAT CD38/CD47–21. Удаление замены E269D умеренно улучшало ADCP у BEAT CD38/CD47–25 и –26 по сравнению с BEAT CD38/CD47–23 и –24. Мутации S239D + I332E, введенные в BEAT CD38/CD47–42, опосредовали самый большой прирост

активности ADCP по сравнению с любым другим конструктом. Аффинности FcγR для предпочтительных конструктов измеряли методом SPR и сравнивали с таковыми у контрольного IgG1 трастузумаба (таблица 7). Наиболее сильные аффинности FcγR коррелировали с наибольшим приростом активности ADCP.

Таблица 7. Модуляция аффинностей FcγR, измеренная методом SPR.

Конструкт	Мутации Fc	Ia [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIa [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIIb [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIIa [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]
BEAT CD38/CD47-21	BEAT(A): S324N + K334E BEAT(B): S324N + K334E	1027	1	0,1	2
BEAT CD38/CD47-42	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	3750	6	14	11

5

Для биспецифических антител, перенаправляющих Т-клетки, в работе Bluemel *et al.*, (2010) *Cancer Immunol Immunother* 59(8): 1197–1209 было показано, что на активность может влиять адресный эпитоп и, таким образом, геометрическое расположение, созданное на поверхности клетки. Соответственно, авторы изобретения предположили, что геометрическое расположение Fc при взаимодействии с мишенью будет определять эффективность связывания C1q и, в свою очередь, степень активации комплемента. Кроме того, авторы изобретения предположили, что аналогичным образом геометрия и расстояния, созданные между биспецифическим антителом BEAT CD38/CD47 и FcγR на иммунных клетках, будут влиять на активность эффекторной функции. С этой целью авторы изобретения исследовали различные связывающие эпитопы в CD38, а также в формате антитела «2 + 1». Биспецифические антитела BEAT «2 + 1» имеют дополнительный домен Fab, слитый с первым доменом Fab через гибкий линкер, обычно глицин-сериновую последовательность (Фиг. 6). Домен Fab, который расположен между Fc антитела и вторым доменом Fab, называется «Fc-проксимальной» связывающей единицей, тогда как домен Fab, который слит с N-концом VH «Fc-проксимального» Fab, называется «Fc-дистальной» связывающей единицей. Аналогично традиционному формату антител BEAT, описанному на Фиг. 3, который теперь называется форматом «1 + 1», неправильного спаривания легких цепей в архитектуре «2 + 1» можно избежать посредством использования cLc, который по существу позволяет добавление к антителу BEAT неограниченного числа различных связывающих доменов. Следовательно, cLc позволяет сконструировать биспецифическое антитело BEAT CD38/CD47, имеющее две связывающие единицы антитела к CD38 с разными последовательностями VH, которые связывают два различных эпитопа в CD38, дополнительно к домену VH, который связывает CD47. Такой конструкт в настоящем документе называют бипаратопным биспецифическим

20

антителом BEAT «2 + 1». Бипаратопное биспецифическое антитело BEAT CD38/CD47 может индуцировать другую геометрию связывания с клеткой-мишенью по сравнению с антителом в формате «1 + 1» или антителом в формате «2 + 1», которое является монопаратопным и имеет две идентичных единицы связывания анти-CD38, что, в свою очередь, может модулировать эффекторную функцию.

- 5 Биспецифические антитела BEAT «2 + 1» конструировали аналогично антителам в формате «1 + 1» с плечом BEAT(A) анти-CD47, сконструированным, как те, которые описаны выше. Плечо антитела к CD38 гетеродимерного иммуноглобулина состояло из BEAT(B) Hc, включающего первый домен VH, который выбран из таблицы 3 (анти-CD38-E2-ResA или анти-CD38-B6), области $\gamma 1$ CH1, глицин-серинового линкера (GGGGSGGGSGGGG), второго домена VH, который выбран из таблицы 3 (анти-CD38-E2-ResA), второй области CH1 $\gamma 1$, шарнирной области $\gamma 1$, области CH2 $\gamma 1$ и основанного на $\gamma 1$ домена BEAT(B) CH3 в сборе с cLc. Биспецифические антитела BEAT «2 + 1», полученные в результате сборки Hc BEAT(A) и BEAT(B), а также cLc, приведены в таблице 8. Важно отметить, что бипаратопные биспецифические антитела BEAT «2 + 1» состояли из доменов VH, которые были нацелены на неперекрывающиеся эпитопы в CD38 и которые могут связываться одновременно (Фиг. 2) (BEAT CD38/CD47-38, -39, -40 и -48). Напротив, монопаратопные биспецифические антитела BEAT «2 + 1» содержали две копии одного и того же домена VH (BEAT CD38/CD47-32 и -34). Биспецифические антитела BEAT «2 + 1» экспрессировали и очищали, как указано выше. Для всех антител регистрировали монодисперсность > 95% по данным эксклюзионной ВЭЖХ при < 1% гомодимерных примесей, как определено по результатам ОФ-ВЭЖХ-МС. Уровни эндотоксина были ниже 5 ЭЕ/мг. Затем биспецифические антитела BEAT CD38/CD47 дополнительно исследовали на их биологическую активность.
- 10
- 15
- 20 Таблица 8. Перечень конструкторов биспецифических антител CD38/CD47 BEAT «2 + 1» с мутациями Fc, усиливающими эффекторную функцию, и без них и их соответствующих SEQ ID NO.

Конструкт	Мутации Fc	Зацепление CD38	Hc BEAT(A)	Hc BEAT(B)	cLc
BEAT CD38/CD47-32	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + E334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + E333A	Монопаратопный	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47-34	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + K334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + K334A	Монопаратопный	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 288	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47-38	Нет	Бипаратопный	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 289	SEQ ID NO: 10

BEAT CD38/CD47–39	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + E333A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + E334A	Бипаратопный	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 290	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–40	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + K334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + K334A	Бипаратопный	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 291	SEQ ID NO: 10
BEAT CD38/CD47–48	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	Бипаратопный	SEQ ID NO: 280	SEQ ID NO: 292	SEQ ID NO: 10

Способность биспецифических антител BEAT «2 + 1» опосредовать CDC по сравнению с антителами в формате «1 + 1» оценивали в клеточном анализе на клетках Daudi. Переход от формата «1 + 1» к формату «2 + 1» в контексте Fc, который не подвергался дополнительному конструированию для эффекторной функции, не улучшил активность CDC

5 (BEAT CD38/CD47–19 по сравнению с –38) (Фиг. 7). Однако в контексте Fc BEAT с усилением архитектура «2 + 1» приводила к повышению активности CDC при более низких концентрациях антител по сравнению с эквивалентным антителом в формате «1 + 1» (BEAT CD38/CD47–40 и –48 по сравнению с –24 и –42). Затем биспецифические антитела BEAT «2 + 1» сравнивали по их способности индуцировать ADCP в клеточном анализе на клетках Raji (Фиг. 8).

10 Монопаратопные биспецифические антитела BEAT «2 + 1» продемонстрировали прирост активности ADCP по сравнению с их аналогами «1 + 1» (BEAT CD38/CD47–32 и –34 по сравнению с –23 и –24), однако уровень фагоцитоза не мог соответствовать такому у наиболее предпочтительного конструкта BEAT CD38/CD47–42 «1 + 1». Интересно, что бипаратопные биспецифические антитела BEAT «2 + 1» продемонстрировали значительный прирост активности ADCP даже с Fc без усиления (BEAT CD38/CD47–38) до уровней конструкта BEAT CD38/CD47–42 «1 + 1» с наибольшим усилением, подтверждая гипотезу о том, что геометрия связывания антител с клеточной поверхностью

15 влияет на эффекторную функцию и что бипаратопное взаимодействие положительно влияет на активность ADCP. Незначительное увеличение аффинностей FcγR в контексте бипаратопных биспецифических антител BEAT «2 + 1» не приводило к дальнейшему улучшению активности ADCP (BEAT CD38/CD47–39 и –40). Бипаратопный конструкт с мутациями S239D + I332E, которые опосредуют наиболее сильное увеличение связывания FcγR, еще не была доступна на момент проведения описанного выше анализа, однако позже в последующем анализе было показано, что она

20 дополнительно усиливала активность ADCP по сравнению с эквивалентным конструктом «1 + 1» (BEAT CD38/CD47–48 по сравнению с –42) (Фиг. 9). Аффинности FcγR для подходящих конструктов измеряли методом SPR и по сравнению с контрольным IgG1 трастузумабом (таблица 9).

Таблица 9. Модуляция аффинностей Fc γ R для конструкций «2 + 1», измеренная методом SPR.

Конструкт	Мутации Fc	Ia [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIa [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIb [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]	IIIa [кратность прироста аффинности по сравнению с контролем]
BEAT CD38/CD47–48	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	864	7	16	10
BEAT CD38/CD47–32	BEAT(A): S324N + S298A + E269D + S333A BEAT(B): S324N + S298A + E269D + K334A	12	0,5	1	3
BEAT CD38/CD47–40	BEAT(A): S324N + S298A + E269D + S334A BEAT(B): S324N + S298A + E269D + S333A	4513	0,4	1	4
BEAT CD38/CD47–34	BEAT(A): S324N + S298A + E269D + K334A BEAT(B): S324N + S298A + E269D + K334A	874	0,4	1	4

В совокупности мутация S324N благоприятно влияла на активность CDC и бипаратопный формат «2 + 1» дополнительно ее усиливал (Фиг. 4 и Фиг. 7). S239D + I332E, введенные асимметрично в тяжелую цепь BEAT(B), приводили к наиболее сильному приросту активности ADCP, которая дополнительно усиливалась бипаратопной архитектурой «2 + 1».

Конструкт CD38/CD47–48 BEAT, который включал в себя все вышеперечисленное, конструировали с использованием «дистального Fc» связывателя анти-CD38 низкой аффинности (анти-CD38-B6, SPR KD = 225 нМ). Созревание аффинности указанного связывателя (таблица 3) позволило сконструировать дополнительное бипаратопное биспецифическое антитело BEAT «2 + 1» с высокой аффинностью «Fc-проксимального» (анти-CD38-E2-ResA) и «Fc-дистального» (анти-CD38-B6-D9) связывающих доменов анти-CD38 (BEAT CD38/CD47–60) (таблица 10). BEAT CD38/CD47–60, а также –42 и 48 временно экспрессировали в CHO, очищали и характеризовали, как описано выше.

Монодисперсность > 95% регистрировали по данным эксклюзионной ВЭЖХ при < 1% гомодимерных примесей, как определено по результатам ОФ-ВЭЖХ-МС. Уровни эндотоксина были ниже 5 ЭЕ/мл.

Таблица 10. SEQ ID NO для конструктора BEAT CD38/CD47–60

Конструктор	Мутации Fc	Зацепление CD38	BEAT(A) Hc	BEAT(B) Hc	cLc
BEAT CD38/CD47–60	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	Бипаратопный	SEQ ID NO: 280	SEQ ID NO: 293	SEQ ID NO: 10

- 5 Затем способность индуцировать CDC, ADCP, а также ADCC оценивали в клеточных анализах для конструктора BEAT CD38/CD47–60 по сравнению с предпочтительными кандидатами –42 и –48. Примечательно, что BEAT CD38/CD47–60, которое в «Fc-дистальном» положении имело высокоаффинный связывающий домен антитела к CD38, индуцировало существенно более мощную CDC, чем BEAT CD38/CD47–48, которое в «Fc-дистальном» положении имело низкоаффинный связывающий домен антитела к CD38 (Фиг. 9). ADCC была аналогичной для всех конструкторов и ADCP клеток Daudi продемонстрировали минимальный прирост для BEAT CD38/CD47–60 по сравнению с –48.

Биофизическая характеристика биспецифических антител BEAT CD38/CD47

- 15 Биспецифические антитела BEAT CD38/CD47 дополнительно характеризовали посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для исследования влияния конструирования эффекторных функций в Fc на термическую стабильность (таблица 11). Соответствующие термограммы для кандидатов BEAT CD38/CD47–42, –48 и –60 изображены на Фиг. 10. Все Fc BEAT с мутациями, усиливающими эффекторную функцию, имели пониженную термическую стабильность по сравнению с Fc BEAT без усиления. Мутации S239D + I332E оказывали наибольшее влияние на термическую стабильность, за ними следует K334E. Другие комбинации мутаций также снижали термическую стабильность, однако в меньшей степени.

- 20 Таблица 11. Резюме тепловых переходов (T_m), наблюдаемых посредством ДСК для биспецифических антител BEAT CD38/CD47.

Конструктор	Мутации Fc	T _{m1} [°C]	T _{m1} [°C]	T _{m3} [°C]
		Fc	Fab 1	Fab 2
BEAT CD38/CD47–3	Нет	69,5	83,5	-
BEAT CD38/CD47–21	BEAT(A): S324N + K334E BEAT(B): S324N + K334E	62,7	78,2	82,0
BEAT CD38/CD47–32	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + E333A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + E333A	64,2	77,6	81,9

BEAT CD38/CD47-34	BEAT(A): E269D + S298A + S324N + K334A BEAT(B): E269D + S298A + S324N + K334A	65,1/67,6	77,6	81,9
BEAT CD38/CD47-40	BEAT(A): S324N + S298A + E269D + K334A BEAT(B): S324N + S298A + E269D + K334A	64,7/67,5	79,1	82,4
BEAT CD38/CD47-42	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	61,3	78,3	82,8
BEAT CD38/CD47-48	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	61,9	79,7	83,0
BEAT CD38/CD47-60	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	62,3	79,0	82,8

Учитывая пониженную термическую стабильность Fc BEAT с усилением, авторы изобретения дополнительно оценили стабильность различных вариантов в 2-недельном исследовании форсированной деградации при 40 °С. Процент монодисперсности, определенный посредством SE-HPLC, не менялся через 2 недели для исходного Fc BEAT, а также для всех исследованных вариантов Fc BEAT с улучшением, в то время как показатель контрольного IgG1 трастузумаба был значительно снижен (таблица 12).

Таблица 12. Результаты исследования форсированной деградации, выполненного на биспецифических антителах CD38/CD47 BEAT.

Конструкт	t = 0 [% монодисперсности]	t = 14,4 °C [% монодисперсности]	t = 7 д., 40 °C [% монодисперсности]	t = 7 д., 40 °C [% монодисперсности]	t = 14 д., 40 °C [% монодисперсности]	Δ [% монодисперсности (t = 0) - (t = 14)]
BEAT CD38/CD47-3	95,8	96,5	96,4	97,2	96,9	1,2
BEAT CD38/CD47-21	98,8	99,5	98,8	99,0	99,2	0,3
BEAT CD38/CD47-40	99,0	99,5	98,9	98,6	97,9	-1,2
BEAT CD38/CD47-42	98,6	99,0	98,6	98,6	98,6	-0,0

BEAT CD38/CD47-48	97,8	98,0	97,4	97,0	95,9	-1,9
Контрольный IgG1	94,9	95,2	73,7	36,9	0	-94,9

Затем авторы изобретения оценивали, повлияло ли конструирование BEAT Fc с улучшением на связывание неонатального рецептора Fc человека (FcRn). FcRn связывается на контактной поверхности между доменами CH2 и CH3, и, таким образом, изменения в Fc потенциально могут модулировать аффинность связывания, что, в свою очередь, может влиять на период полувыведения из сыворотки (Martin *et al.*, (2001) Mol Cell 7(4): 867-877). Аффинности вариантов Fc BEAT с улучшением для FcRn определяли методом SPR (таблица 13). Связывание FcRn не подвергалось отрицательному влиянию дополнительного конструирования Fc BEAT, и значения KD находились в диапазоне значений, измеренных для контрольного IgG1 трастузумаба.

Таблица 13. Измерения методом SPR для связывания BEAT CD38/CD47 с FcRn

Конструкт	Мутации Fc	Соотношение KD [BEAT/контрольный IgG1]
BEAT CD38/CD47-21	BEAT(A): S324N + K334E BEAT(B): S324N + K334E	0,4
BEAT CD38/CD47-40	BEAT(A): S324N + S298A + E269D + K334A BEAT(B): S324N + S298A + E269D + K334A	0,3
BEAT CD38/CD47-42	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	0,5
BEAT CD38/CD47-48	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	0,2
BEAT CD38/CD47-60	BEAT(A): S239D + I332E + S324N BEAT(B): S324N	0,5

Пример 6. Биологическая характеристика кандидатов BEAT CD38/47-48 и BEAT CD38/47-60 *in vitro*

Пример 6.1. Характеристика активности связывания BEAT CD38/47-48 и 60 клеточных линий множественной миеломы и лимфомы *in vitro*

Материал и методы

На 96-луночный планшет с U-образным дном (TPP) наносили по сто тысяч клеток на лунку и центрифугировали при 350 g в течение 5 минут. Супернатанты удаляли посредством стряхивания планшетов, и клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл первично очищенных антител с дозозависимым ответом. Клетки инкубировали в течение

30 минут при 4 °С (темнота). После двух стадий промывки (350 g в течение 5 минут) клетки окрашивали моноклональным мышинным антителом к IgG-Fc человека, конъюгированным с фикоэритрином (PE), разбавленным в соотношении 1/200 в буфере для FACS, в течение 30 минут при 4 °С. После последней стадии промывки клетки суспендировали в буфере для FACS, содержащем Sytox (1/2000) или Dapi (1/50 000).

5 Затем выполняли проточный цитометрический анализ с помощью Cytoflex (Beckman Coulter).

Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD): для каждого образца получали среднее геометрическое интенсивностей флуоресценции (geoMFI) PE отдельных жизнеспособных клеток. Поскольку антитела могут демонстрировать некоторое неспецифическое связывание с клетками, нормализацию выполняли с использованием geoMFI изотипического контрольного антитела (ABC-IgG1). Для получения относительной интенсивности флуоресценции (ОИФ) значения geoMFI от контрольного окрашивания вычитывали из значений geoMFI каждой молекулы. Все значения KD рассчитывали с использованием ОИФ. Для некоторых кривых значения geoMFI при самой высокой концентрации исключали из-за наблюдения эффекта «сползания».

10

Для расчета KD на значениях ОИФ в программном обеспечении Prism (GraphPad) применяли нелинейную регрессию связывания одного сайта (гипербола).

15 Результаты и выводы

Связывание BEAT CD38/47–48 и –60 оценивали посредством проточной цитометрии на панели линий клеток множественной миеломы (KMS-12-PE, KMS-12-BM, NCI-H929) и лимфомы (Raji, Daudi), экспрессирующих разный уровень CD38 и CD47 (Фиг. 11). Для этого исследования рациональной была оценка Kd BEAT 38/47–48 и –60, а также понимание их связывания с линиями опухолевых клеток по сравнению со связыванием моноклональных антител к CD38 (Darzalex) или к CD47 (5F9-подобный, магролимаб).

20

BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 демонстрируют более высокий уровень связывания с линиями опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии CD38 (CD38 high) (Daudi, Raji, KMS-12-PE) по сравнению с эталонными Darzalex и 5F9. Дополнительно BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 демонстрируют более высокий уровень связывания с линиями опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии CD38 (CD38 low) (NCI-H929 и KMS-12-BM) по сравнению с Darzalex. Клетки множественной миеломы у пациентов демонстрируют ряд признаков первичных или приобретенных механизмов ускользания опухоли, включающих стимуляцию сигнала CD47 «не ешь меня» и угнетение CD38 клеточной поверхности (например, у пациентов, получающих Darzalex в качестве стандартной терапии). BEAT 38/47 выполнены с возможностью преодоления обоих этих механизмов ускользания опухоли и улучшения нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие CD38, по сравнению со стандартной терапией Darzalex. Текущие данные о связывании клеток позволяют предположить, что совместное нацеливание на CD38 и CD47 может обеспечить лучшее терапевтическое окно по сравнению с текущим эталоном, особенно в опухолевых клетках MM с низким уровнем CD38.

25

30

Пример 6.2. Ингибирование BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 взаимодействий CD47-SIRP α

Материалы и методы

10 × 10³ клеток Daudi, меченных 8 мкМ Hoescht (Thermofisher, № кат. 33342), наносили по 20 мкл на 384-луночные
 планшеты с прозрачным дном (Corning, № кат. 3770) и совместно инкубировали с 20 мкл тестового антитела
 5 возрастающей концентрации (от 0,00015 нМ до 640 нМ) в течение 30 минут при 4 °С. Параллельно смесь антител
 (смесь для обнаружения), состоящую из 300 нг/мл гибридного белка Fc SIRPα-mlgG1 (Accrobiosystem, № кат. SIA-
 H52A8) и 2,5 мкг/мл реагента для обнаружения Alexa Fluor 647-конъюгированного антитела к мышинному Fc IgG
 (Jackson ImmunoResearch, № кат. 115-605-205), готовили в буфере для анализа (PBS + 2,5% FBS + 0,1% NaN₃) и
 инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Смесь для обнаружения (20 мкл) добавляли к
 10 клеткам и инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре. Связывание рекомбинантного SIRPα-Fc с
 опухолевыми клетками определяли количественно посредством анализа изображений с использованием платформы
 для скрининга высокого содержания CellInsight CX5 (Thermo Fisher Scientific). Ингибирование CD47/SIRPα,? показано
 как процент ингибирования флуоресцентного сигнала смеси для обнаружения.

Результаты и выводы

15 Повсеместно присутствующая иммунная контрольная точка CD47 работает как сигнал «не ешь меня», ингибирующий
 фагоцитоз при связывании с родственным ему рецептором SIRPα, экспрессируемым макрофагами. Опухолевые клетки
 перехватывают этот механизм и сверхэкспрессируют CD47 в качестве механизма иммунного уклонения для избегания
 фагоцитоза. BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 предназначены для селективного блокирования CD47-SIRPα на
 клетках, экспрессирующих CD38, при совместном взаимодействии с мишенью и усилении антителозависимого
 20 клеточного фагоцитоза. Поэтому авторы изобретения оценивали эффективность BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–
 60 для ингибирования взаимодействия CD47/SIRPα на CD38-положительных опухолевых клетках (Фиг. 12) с
 использованием моделей *in vitro* и анализа на основе изображений.

Несмотря на низкую аффинность к CD47 BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 демонстрируют эффективное
 ингибирование взаимодействия CD47/SIRPα на клетках Daudi. Это сравнимо со способностью высокоаффинного
 антитела к CD47 5F9 ингибировать взаимодействие CD47/SIRPα. В целом данные свидетельствуют о том, что
 25 объединение связывателя анти-CD38 позволяет ингибировать взаимодействие CD47/SIRPα даже в присутствии
 низкоаффинного связывателя CD47.

**Пример 6.3. BEAT38/47–48 и –60 демонстрируют лучшее уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих
 CD38^{low}, посредством антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) по сравнению с клиническим
 эталоном Darzalex**

Материал и методы

1,5 × 10⁴ опухолевых клеток, меченных 1 мкг/мл pH-rodo Red SE с 3 × 10³ макрофагов, полученных из моноцитов,
 окрашенных 2,5 мкМ Cell trace violet (соотношение эффектор : мишень = 5 : 1) наносили на 384-луночные планшеты
 с прозрачным дном. В некоторых экспериментах в каждую лунку добавляли либо 2,8 нг/мл sCD38, либо 500 М/мл

эритроцитов для оценки влияния поглотителя антигена CD38 и CD47. Затем в лунку добавляли тестовое антитело в возрастающей концентрации и инкубировали в течение 2 ч 30 мин при 37 °С, 5% CO₂. Впоследствии фагоцитоз оценивали с использованием платформы для скрининга высокого содержания CellInsightCX5 и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа клеток HCS Studio. Фагоцитоз количественно определяли с использованием анализа на основе изображений как среднее количество ярких опухолевых клеток, окрашенных pHrodo, на 100 trace violet-положительных макрофагов.

Результаты и выводы

Опухолевые клетки развили механизмы для уклонения от распознавания иммунной системой, включая перехват оси CD47-SIRP α . Действительно, CD47 сверхэкспрессируется у пациентов с ММ, при этом сообщается, что почти 100% CD38-позитивных клеток миеломы экспрессируют CD47 на высоком уровне. Экспрессия CD47 связана с прогрессированием заболевания и низким ответом на терапию, как при гематологических злокачественных опухолях, так и при солидных опухолях.

Молекулы, нейтрализующие CD47/SIRP α , продемонстрировали противоопухолевую активность в отношении широкого спектра линий опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Описано, что *in vitro* блокирующие CD47/SIRP α антитела восстанавливают фагоцитоз опухолевых клеток и усиливают антителозависимый клеточный фагоцитоз, инициируемый антителами, нацеленными на опухоль, такими как ритуксимаб или трастузумаб. Несколько подходов к нацеливанию на CD47 разработаны как в доклинических, так и в клинических условиях; более значимым является антитело Hu5F9-G4 к CD47 — моноклональное антитело с двумя высокоаффинными плечами Fab к CD47 со слабой/отсутствующей функцией Fc в формате IgG4 (в настоящем документе обозначено как 5F9). Из-за своего низкофункционального участка Fc IgG4 5F9 главным образом работает в комбинации, как сообщалось в клинических испытаниях, в качестве партнера в комбинации, проявляющего синергизм с ритуксимабом при лечении неходжкинских лимфом. Отличным образом для 5F9 BEAT CD38/47–48 и –60 усиливает ADCP в качестве самостоятельной молекулы посредством избирательной блокировки взаимодействия CD47-SIRP α на экспрессирующих CD38 опухолевых клетках, одновременно активируя фагоцитоз через свой Fc, усиленный для эффекторных функций, включая усиленный ADCP. Дополнительно BEAT CD38/47–48 и –60 отличается от стандартного лечения ММ Darzalex, поскольку предполагается, что он усиливает активность ADCP в отношении клеток ММ посредством нацеливания на опухолевые клетки CD38 и одновременно взаимодействий CD47/SIRP α . Способность кандидатов BEAT 38/47^{top} ингибировать взаимодействие CD47/SIRP α оценивали *in vitro* в анализе конкурентного связывания с использованием гибридного белка SIRP α -Fc. Как BEAT 38/47–48, так и –60 эффективно ингибировали взаимодействия CD47/SIRP α в опухолевых клетках *in vitro* в степени, сравнимой со степенью при опосредовании 5F9 (пример 6.2).

Авторы изобретения оценили активность ADCP BEAT 38/47–48 и –60 против опухолевых клеток по сравнению с клиническими эталонами 5F9 и Darzalex. Как BEAT 38/47–48, так и –60 продемонстрировали максимальный уровень индукции фагоцитоза опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{high}, сравнимый с уровнем при опосредовании Darzalex. В отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{high}, Darzalex продемонстрировал несколько более высокую, хотя и статистически значимую активность по сравнению с таковой у BEAT 38/47–48 и –60, измеренной по

ее более низкому значению EC50. Напротив, на опухолевых клетках, экспрессирующих CD38^{low}, как BEAT 38/47–48, так и –60 индуцировали более высокий статистически значимый фагоцитоз опухолевых клеток на уровне, который в два раза превышал уровень, индуцируемый Darzalex, измеренный по их максимальному индексу фагоцитоза (Фиг. 13 и таблица 14). Несмотря на блокирование взаимодействия CD47/SIRP α только одним плечом Fab низкой аффинности оба из BEAT 38/47–48 и –60 продемонстрировали эффективность, сравнимую с эффективностью 5F9, в индукции фагоцитоза опухолевых клеток, экспрессирующих как CD38^{high}, так и CD38^{low}. Последний пункт имеет большое значение, поскольку он свидетельствует о том, что снижение аффинности антител к CD47 не влияет на фагоцитоз опухолевых клеток в формате BEAT CD38/47 при нацеливании на опухолевые клетки посредством одновременного наличия двух плеч Fab антител с высокой аффинностью к CD38. При сравнении собственных внутренних клинических кандидатов BEAT 38/47–48 и –60 авторы изобретения не обнаружили различий в их активности, измеренной как по максимальному уничтожению, так и по EC50 в опухолевых клетках, экспрессирующих либо CD38^{high}, либо CD38^{low} (Фиг. 13).

Эти данные свидетельствуют о том, что конфигурация BEAT CD38/47 обеспечивает фагоцитоз опухолевых клеток, сравнимый с 5F9, хотя и резко снижает аффинность к CD47, тем самым потенциально улучшая CD47 на мишени. Действительно, нацеливание на CD47 может быть затруднено вследствие его повсеместной экспрессии; эритроциты и тромбоциты относятся к лучше охарактеризованным типам клеток в связи с зависимостью их клиренса от экспрессии CD47. Таким образом, критическим аспектом при разработке терапии антител к CD47 является уменьшение перекрестного связывания эритроцитов (или тромбоцитов), которые являются основными поглотителями антигена. Фактически, вследствие его целевого связывания с эритроцитами, 5F9 вызывал дозозависимую анемию у 27–41% пациентов с неходжкинской лимфомой (НХЛ), получавших лечение. Дополнительно формат BEAT CD38/47 продемонстрировали индукцию более высокой активности в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, по сравнению с таковой, индуцируемой стандартной терапией Darzalex. В целом данные авторов изобретения свидетельствуют о том, что как BEAT 38/47–48, так и –60 имеют улучшенную активность по сравнению со стандартной терапией MM в условиях низкой доступности антигена CD38, при этом имея более благоприятную нацеленность на эритроциты, чем та, что была зарегистрирована для 5F9.

Таблица 14. Значения статистики рассчитаны для опухолевых клеток CD38^{high} (Daudi) или CD38^{low} (KMS12-BM) с использованием критериев множественного сравнения Тьюки. НЗ = не значимый. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

Условия	CD38 ^{high}		CD38 ^{low}	
	Макс. фагоцитоз	EC50	Макс. фагоцитоз	EC50
BEAT 38/47–48 по сравнению с Darzalex	НЗ	> 0,001	> 0,001	Н/О
BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	НЗ	> 0,05	> 0,01	Н/О
BEAT 38/47–48 по сравнению с 5F9	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
BEAT 38/47–60 по сравнению с 5F9	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ

Darzalex по сравнению с 5F9	НЗ	> 0,05	> 0,01	Н/О
BEAT 38/47–60 по сравнению с BEAT 38/47–48	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ

Пример 6.4. BEAT 38/47–48 и –60 демонстрируют лучшее уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, по сравнению с антителами к CD47 с моноплечом

Материал и методы

- 5 Эксперименты проводят, как описано в параграфе «Материал и методы» примера 6.3.

Результаты и выводы

- Чтобы оценить, улучшало ли совместное нацеливание на CD38 и CD47 функции BEAT 38/47 по сравнению с антителом к CD38 или антителом к CD47 с одиночным нацеливанием, авторы изобретения проанализировали способность BEAT 38/47–48 и –60 индуцировать ADCP опухолевых клеток по отношению к их моноплечам CD38 или CD47 (Фиг. 14А).
- 10 Как BEAT 38/47–48, так и –60 продемонстрировали усиленный ADCP опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, по измерению их более выраженного максимального фагоцитоза по сравнению с CD38–59 и –79 с моноплечом соответственно. Дополнительно, хотя CD47–54 с моноплечом достигало аналогичной или более высокой индукции фагоцитоза опухолевых клеток по сравнению с BEAT 38/47–48 и –60 (в 3 из 7 экспериментов), его активность в индукции фагоцитоза была ниже, чем таковая у BEAT 38/47–48 и –60, как измерено по более высокому значению EC50
- 15 (Фиг. 14В и таблица 15).

В целом BEAT 38/47–48 и –60 демонстрируют улучшенную активность по сравнению с их родственными антителами к CD38 и антителами к CD47 с моноплечами, что позволяет предположить, что формат BEAT, по счастливой случайности, индуцирует лучшую активность у пациентов, чем та, которая индуцируется посредством нацеливания на один CD38 или CD47.

- 20 Таблица 15. Значения статистики рассчитаны для опухолевых клеток CD38^{low} (KMS12-BM) с использованием критериев множественного сравнения Тьюки.

Условия	Макс. фагоцитоз	EC50
BEAT 38/47–48 по сравнению с CD47–54 с моноплечом	> 0,05	> 0,05
BEAT 38/47–60 по сравнению с CD47–54 с моноплечом	> 0,05	> 0,05
BEAT 38/47–48 по сравнению с CD38–59 с моноплечом	> 0,05	> 0,05
BEAT 38/47–60 по сравнению с CD38–79 с моноплечом	> 0,05	> 0,05

Пример 6.5. BEAT 38/47–48 и –60 демонстрируют лучшее уничтожение опухолевых клеток посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) по сравнению с клиническими эталонами

Материал и методы

Опухолевые клетки метили 5 мкМ кальцеина АМ и наносили на 96-луночные планшеты с возрастающей концентрацией тестового антитела и в присутствии сыворотки человека в течение 4 ч 30 мин при 37 °С, 5% CO₂. В некоторых экспериментах в каждую лунку добавляли либо 2,8 нг/мл sCD38, либо 500 М/мл эритроцитов для оценки влияния поглотителя антигена CD38 и CD47.

В качестве положительного контроля для максимального уничтожения опухолевых клеток использовали Triton X-100. После завершения анализа клетки центрифугировали при 350 g в течение 5 минут для осаждения клеток. Затем 100 мкл супернатанта осторожно переносили в черный плоскодонный 96-луночный планшет без переноса клеток. Флуоресценцию, индуцированную высвобождением кальцеина, считывали с помощью считывающего устройства для планшетов Synergy с использованием следующих параметров:

- длина волны возбуждения: 485 нм;
- длина волны излучения: 515 нм.

Специфическое уничтожение вычисляли в соответствии с формулой:

% специфического уничтожения = [(высвобождение в тестовых условиях – спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение TritonX100 – спонтанное высвобождение)].

Результаты и выводы

Взаимодействие участка Fc связанного антитела-мишени с C1q, первым субкомпонентом системы комплемента C1, активирует путь системы комплемента и в конечном итоге индуцирует CDC. Это один из механизмов действия (МОА) большинства клинически подтвержденных антител для уничтожения опухолевых клеток, включая стандартную терапию MM Darzalex. Опухолевая клетка развивается и проходит несколько механизмов ускользания от иммунного ответа, включая ускользание от медикаментозного лечения (приобретенные механизмы ускользания). Применительно к MM ускользание от уничтожения CDC является одним из наиболее хорошо установленных механизмов устойчивости к Darzalex, который в конечном итоге приводит к рецидиву заболевания. Приобретенные механизмы ускользания от CDC являются многофакторными и все еще нуждаются в полном понимании. Однако на них влияют несколько факторов, в том числе плотность антигена на опухолевых клетках (угнетение CD38), а также сверхэкспрессия регуляторных белков комплемента (включая CD46, CD55 и CD59). По этим причинам BEAT 38/47-48 и -60 были разработаны с использованием специального конструирования их участков Fc для усиления эффекторных функций Fc, включающих CDC (как сообщалось в WO 2011104604). Кроме того, как ранее сообщалось в этом патенте, оба BEAT, 38/47-48 и -60, в своей архитектуре 2 + 1 имеют уже усиленную CDC по сравнению с архитектурой 1 + 1, наиболее вероятно, в результате усиления кластеризации CD38 в клеточной поверхности для оптимального уничтожения CDC (см. пример 5 и Фиг. 7).

Авторы изобретения оценили активность BEAT 38/47-48 и -60 против опухолевых клеток с точки зрения индукции CDC по сравнению с клиническими эталонами. Оба из BEAT 38/47-48 и -60 продемонстрировали статистически

5 значимое более выраженное уничтожение опухолевых клеток посредством CDC по сравнению с Darzalex. Как и ожидалось, 5F9-подобное антитело не индуцировало какого-либо детектируемого уничтожения посредством CDC в соответствии с его низким/отсутствующим эффекторным форматом Fc IgG4. При сравнении собственных внутренних клинических кандидатов BEAT 38/47–48 и –60 авторы изобретения обнаружили, что BEAT 38/47–60 продемонстрировало статистически значимое отличие в активности, измеренной по более низкому EC50 CDC. Между двумя BEAT CD38/47 не было обнаружено различий в максимальном уничтожении (Фиг. 15 и таблица 16).

10 Эти данные свидетельствуют о том, что модулирование эффекторной функции Fc с помощью специальных мутаций, усиливающих CDC, повышает активность по сравнению с использованием класса IgG-1 дикого типа (ДТ), как в Darzalex. К счастью, эта улучшенная активность по сравнению с Darzalex способствует усилению активности BEAT 38/47 у пациентов в контексте возможного нарушения CDC.

Таблица 16. Значения статистики рассчитаны для опухолевых клеток CD38^{high} (Daudi) с использованием критерия множественного сравнения Тьюки (для макс. уничтожения) и Т-теста (для EC50). НЗ = не значимый.

Условия	Макс. уничтожение	EC50
BEAT 38/47–48 по сравнению с Darzalex	> 0,0005	НЗ
BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	> 0,0005	НЗ
BEAT 38/47–60 по сравнению с BEAT 38/47–48	НЗ	> 0,005

15 **Пример 6.6. BEAT 38/47–48 и –60 демонстрируют лучшее уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) по сравнению с клиническими эталонами**

Материал и методы

20 Опухолевые клетки сначала метили 1 мкМ eFluor670 и впоследствии наносили на 96-луночный планшет с увеличивающимися концентрациями BEAT 38/47 или контрольных антител. Затем добавляли очищенные НК-клетки для приготовления окончательного соотношения эффектор : мишень (E : T) 5 : 1. Планшеты инкубировали при 37 °C, 5% CO₂. После инкубирования в течение 4 ч 30 мин планшеты центрифугировали. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего либо Sytox (1/2000), либо Dapi (1/50 000).

25 Затем выполняли проточный цитометрический анализ с помощью Cytoflex (Beckman Coulter). Жизнеспособные опухолевые клетки определяли как положительные для eFluor670 и отрицательные для красителя Sytox для мертвых клеток.

Затем регистрировали абсолютное количество живых опухолевых клеток и рассчитывали % гибели и % специфической ADCC по следующим формулам:

% специфического уничтожения = $(1 - (\text{количество антител-мишеней/лунка образца I} / \text{среднее количество антител-мишеней/лунка только мишени})) * 100$

% специфической ADCC = % специфического уничтожения *образца* – % специфического уничтожения *без антитела*

Результаты и выводы

- 5 Взаимодействие участка Fc связанного с мишенью Fcγ-рецептора III (CD16) антитела активирует NK-клетки и индуцирует мощную дегрануляцию, приводящую к ADCC опухолевых клеток. ADCC вместе с CDC является одним из наиболее хорошо охарактеризованных MOA Fc-компетентных антител для уничтожения опухолевых клеток и считается одним из наиболее важных механизмов, индуцируемых Darzalex для уничтожения клеток ММ.

- 10 Авторы изобретения оценили активность ADCC BEAT 38/47–48 и –60 против опухолевых клеток по сравнению с клиническими эталонами (Фиг. 16 и таблица 17). Оба из BEAT 38/47–48 и –60 продемонстрировали уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{high}, сравнимое с индуцируемым посредством Darzalex. Напротив, на опухолевых клетках, экспрессирующих CD38^{low}, как BEAT 38/47–48, так и –60, хотя и достигали максимального уровня уничтожения опухолевых клеток, схожего с таким у Darzalex, демонстрировали более заметную активность, измеренную посредством статистически значимого более низкого EC50 уничтожения. Аналогично тому, что уже
- 15 показано с CDC, 5F9-подобное антитело не индуцировало какого-либо детектируемого уничтожения посредством ADCC в соответствии с его низким/отсутствующим эффекторным форматом Fc IgG4. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие двух бипаратопных плеч Fab CD38 в BEAT CD38/47–48 и –60 может повысить эффективность ADCC при невысоком уровне CD38 на клеточной поверхности. При сравнении собственных внутренних клинических кандидатов BEAT 38/47–48 и –60 авторы изобретения не обнаружили различий в их активности, измеренной как по
- 20 максимальному уничтожению, так и по EC50 в опухолевых клетках, экспрессирующих либо CD38^{high}, либо CD38^{low}

Улучшенная активность ADCC по сравнению с Darzalex в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}, к счастью, способствует повышенной активности у пациентов, у которых в результате подавляющей модуляции антигена вследствие лечения Darzalex наблюдается низкая экспрессия CD38, а также в отношении клонов ММ, имеющих низкий уровень CD38 вследствие приобретенных механизмов ускользания от иммунного ответа.

- 25 Таблица 17. Значения статистики рассчитаны с использованием критериев множественного сравнения Тьюки в опухолевых клетках CD38^{high} (Raji) или CD38^{low-int} (NCI-H929). НЗ = не значимый.

Условия	Опухолевые клетки CD38 ^{high}		Опухолевые клетки CD38 ^{low}	
	Макс. фагоцитоз	EC50	Макс. фагоцитоз	EC50
BEAT 38/47–48 по сравнению с Darzalex	НЗ	НЗ	НЗ	> 0,05
BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	НЗ	НЗ	НЗ	> 0,05
BEAT 38/47–60 по сравнению с BEAT 38/47–48	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ

Пример 6.7. BEAT CD38/47–48 и BEAT CD38/47–60 индуцируют уничтожение опухолевых клеток MM NCI-H929, измеряемое с помощью анализа уничтожения посредством множественного механизма действия (ММоАК)

Материал и методы

Мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC) от здоровых добровольцев собирали из лейкоцитарной пленки, полученной из центра переливания крови La Chaux-de-Fonds Transfusion Center. Для обработки фильтрацией крови лейкоцитарные пленки разбавляли в 50 мл PBS (разведение 1/2) и впоследствии переносили в 3 пробирки SepMate, предварительно наполненные Ficoll. Выделение проводили по инструкции производителя (центрифугирование при 1200 g в течение 10 минут с тормозом). Мононуклеарный слой переносили в пробирки falcon объемом 50 мл, PMBC промывали 3 раза в PBS (300 g в течение 10 мин), подсчитывали и замораживали при -80 °C. За день до анализа аутологичские PMBC размораживали и инкубировали в полной среде на протяжении ночи при 37 °C. Моноциты человека очищали от замороженных PMBC и дифференцировали в макрофаги посредством их культивирования в течение 7 дней в полной среде, содержащей 50 нг/мл M-CSF.

Анализ ММоАК

В день эксперимента 1×10^5 PMBC + 5000 аутологичских макрофагов, полученных из моноцитов, наносили на 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением с опухолевыми клетками, меченными 5 мкМ eFluor 670, в присутствии 50% сыворотки человека. В некоторых экспериментах (Фиг. 18) для оценки влияния поглотителя антигена CD38 и CD47 в каждую лунку добавляли либо 2,8 нг/мл sCD38, или 500 М/мл эритроцитов. Далее в лунку добавляли тестовое антитело и контрольные антитела в возрастающей концентрации и инкубировали в течение дополнительных 48 ч при 37 °C, 5% CO₂. После завершения анализа клетки центрифугировали при 350 g в течение 10 минут и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего либо Sytox (1/2000), либо Dapi (1/50 000). Образцы получали с использованием проточного цитометра Cytotflex и анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo (tree star).

Жизнеспособные опухолевые клетки определяли как положительные для eFluor-670 и отрицательные для красителя Sytox для мертвых клеток. Впоследствии регистрировали абсолютное количество живых опухолевых клеток и рассчитывали % уничтожения и % специфического уничтожения по следующим формулам:

- уничтожающую способность BEAT 38/47 количественно определяли с использованием формулы:
- % специфического уничтожения = $(1 - (\text{количество антител-мишеней/лунка образца} / \text{среднее количество антител-мишеней/лунка только мишени})) * 100$

Результаты и выводы

С физиологической точки зрения антителозависимые эффекторные функции проявляются не как отдельные явления, а скорее одновременно. Для точного сравнения активности BEAT 38/47–48 и –60 и эталонов *in vitro* был разработан

оптимизированный анализ множественного механизма уничтожения (Фиг. 17А). Он состоит из совместной культуры РВМС человека, стимулированных 100 ЕД/мл IL-2, с опухолевыми клетками в присутствии человеческой сыворотки и аутологических макрофагов, полученных из моноцитов. При таком подходе в присутствии тестовых антител опухолевые клетки уничтожаются с помощью множества механизмов, таких как ADCC посредством NK-клеток, активированных IL-2, перенаправленного лизиса (RDL) посредством Т-клеток, CDC посредством комплемента и ADCP (опосредованного присутствием фагоцитов). Важно отметить, что в анализах ММоАК человеческая сыворотка также действует как источник иммуноглобулинов (Ig) человека, ключевого элемента для оценки активности антителозависимых эффекторных функций в присутствии физиологических уровней Ig. Таким образом, с помощью этого анализа активность уничтожения BEAT 38/47–48 и –60 можно количественно определить и точно сравнить с эталонами.

В этих условиях 5F9 не индуцировал уничтожение опухолевых клеток на обнаруживаемом уровне, наиболее вероятно вследствие наличия Fc IgG4 с минимальной эффекторной функцией, таким образом вытесняя Ig, присутствующие в сыворотке, из конкуренции за Fc-рецепторы. В противоположность этому, BEAT 38/47–48 и –60 демонстрировали заметное уничтожение опухолевых клеток, в два раза превышающее такое, индуцированное посредством Darzalex (Фиг. 17В). При сравнении собственных внутренних клинических кандидатов не было обнаружено никаких различий в максимальном уничтожении между двумя BEAT CD38/47, однако BEAT 38/47–60 продемонстрировало статистически значимую разницу в активности, измеренную по более низкому EC50 в ММоАК (Фиг. 17С и D).

CD38 может высвобождаться в сыворотке, и доля циркулирующего растворимого CD38 (sCD38) увеличивается со стадией заболевания при ММ, тем самым потенциально функционируя в качестве поглотителя для CD38 и, таким образом, ограничивая эффективность терапии, нацеленной на CD38. Вместе с этим, на основании высокого уровня экспрессии CD47 на эритроцитах большое число циркулирующих эритроцитов могло быть вторым основным поглотителем антигена для BEAT 38/47–48 и –60. Таким образом, влияние sCD38 и высокой концентрации эритроцитов оценивали в ММоАК для исследования того, влияет ли поглотитель антигена на активность BEAT 38/47–48 и –60 *in vitro*. Наличие или отсутствие sCD38 при 2,8 нг/мл (концентрация, которая определяется в костном мозге пациента) не влияло на уничтожение опухолевых клеток с помощью BEAT 38/47–48 и –60 с помощью ММоАК, измеренное по отсутствию различия в максимальном уничтожении или EC50 (Фиг. 18 и таблица 18). Аналогичным образом высокая концентрация эритроцитов (500 миллионов/мл) (Фиг. 18) не влияла на этот механизм уничтожения.

В целом посредством использования анализа *in vitro*, целью которого является резюмирование сложности МОА Fc-компетентного антитела *in vivo*, авторы изобретения обнаружили, что BEAT 38/47–48 и –60 демонстрируют важные видоизменения с точки зрения активности по сравнению со стандартной терапией ММ Darzalex. Кроме того, этот анализ показывает, насколько важна правильная активность функций Fc, поскольку в присутствии сыворотки 5F9 полностью утрачивает свою способность к фагоцитозу опухолевых клеток, экспрессирующих CD38^{low}. Важно отметить, что поглощение антигена CD38 или CD47 не влияло на активность BEAT 38/47–48 и –60 *in vitro*. Эти результаты и их трансляционная значимость убедительно подтверждают, что BEAT 38/47–48 и –60 будут иметь заметную активность у пациентов с ММ, которая, к счастью, превосходит таковую при стандартной терапии Darzalex.

Основываясь на всех исследованных параметрах, оба BEAT не демонстрируют значительных различий в отношении активности *in vitro*. Тем не менее BEAT 38/47–60 продемонстрировало улучшенную активность по сравнению с BEAT 38/47–48 в CDC и ММоАК и, следовательно, получило больший приоритет в качестве клинического кандидата авторов изобретения, чем BEAT 38/47–48.

- 5 Таблица 18. Значения статистики, рассчитанные с использованием критериев множественного сравнения однофакторного дисперсионного анализа в опухолевых клетках CD38^{low-int} (NCI-H929). НЗ = не значимый. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

Условия	Макс. уничтожение	EC50
BEAT 38/47–48 по сравнению с Darzalex	> 0,01	НЗ
BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	> 0,05	НЗ
BEAT 38/47–48 по сравнению с 5F9	> 0,0001	Н/О
BEAT 38/47–60 по сравнению с 5F9	> 0,0001	Н/О
Darzalex по сравнению с 5F9	НЗ	Н/О
BEAT 38/47–60 по сравнению с BEAT 38/47–48	НЗ	> 0,05

Пример 6.8. BEAT38/47–60 демонстрируют более высокую активность по сравнению с комбинацией эталонных Darzalex и 5F9 *in vitro*

Материал и методы

ММоАК выполняли в соответствии с описанием в примере 6.7. Для условия комбинации (Darzalex + 5F9) Darzalex исследовали дозозависимым образом, подобно BEAT 38/47–60, в то время как 5F9 применяли в насыщающей концентрации (160 нМ).

Результаты и выводы

Darzalex является стандартной терапией ММ и маглолимаб успешно используют в сочетании с антителом, нацеленным на опухоль (т. е. ритуксимабом) (MARK P. CHAO ET AL. Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. September 3, 2010. Cell 142, 699–713), для усиления фагоцитоза опухолевых клеток. Таким образом, исключительно важным было решение вопроса, заключающегося в понимании, будет ли концепция BEAT 38/47 демонстрировать лучшую эффективность в отношении опухолевых клеток по сравнению с возможной комбинацией Darzalex с блокатором CD47. Действительно, такая комбинация уже была представлена в контексте острого лимфобластного лейкоза, где было обнаружено, что она демонстрирует улучшенную эффективность по сравнению с монотерапией CD38 (FOTINI VOGIATZI, ET AL. Co-Targeting of CD38 and CD47 in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia 614. Acute lymphoblastic leukemia: therapy, excluding transplantation. November 5, 2020.

Blood (2020) 136 (Supplement 1): 39). Следовательно, авторы изобретения оценивали активность BEAT 38/47–60 по сравнению с комбинацией Darzalex с маглолимаб-подобным антителом (5F9) в анализах ММоАК, чтобы резюмировать все эффекторные функции, а также конкуренцию рецептора Fc с циркулирующими Ig. Для строгого сравнения маглолимаб-подобный препарат применяли в насыщающих дозах в комбинации с Darzalex, исследованным в различных концентрациях в качестве BEAT 38/47–60. В этих условиях BEAT 38/47–60 продемонстрировали статистически значимое более выраженное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с индуцированным комбинацией Darzalex с 5F9 (Фиг. 19 и таблица 19). Эти данные свидетельствуют о том, что несмотря на более низкую аффинность к CD47 в одном плече Fab посредством блокирования CD47 на контактной поверхности эффектора и мишени используемого формата BEAT, посредством зависящего от avidности перекрестного связывания с использованием высокоаффинных плеч Fab антитела к CD38 индуцируют более высокую активность опухолевых клеток по сравнению с комбинацией высокоаффинных моноклональных антител к CD38 и к CD47.

Таблица 19. Значения статистики рассчитаны с использованием критериев множественного сравнения Тьюки в опухолевых клетках CD38^{high} (Raji) или CD38^{low-int} (NCI-H929). Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

Условия	Макс. фагоцитоз	EC50
BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + 5F9)	< 0,01	Н/О

Пример 6.9. BEAT 38/47–60 не конкурируют с Darzalex за связывание с CD38 в клетках и на их активность не влияет сопутствующая обработка Darzalex *in vitro*

Материалы и методы

Клетки Raji-CD47KO инкубировали с насыщающей концентрацией Darzalex-AF647, BEAT 38/47-AF488 или смеси Darzalex-AF647 + BEAT 38/47-AF488 (Фиг. 20A–C). После стадий промывки флуоресценцию анализировали цитометром Cytoflex. На Фиг. 20A–C представлены типичные точечные диаграммы проточной цитометрии.

Что касается Фиг. 20D, перед добавлением насыщающей концентрации BEAT 38/47-AF488 клетки Raji-CD47KO предварительно инкубировали с насыщающей концентрацией контрольного IgG1, Darzalex или очищенных антител BEAT 38/47 в течение 30 мин при 4 °C. После этапов промывки флуоресценцию анализировали цитометром Cytoflex и впоследствии рассчитывали % конкуренции с BEAT 38/47-AF488. Здесь приводится среднее значение дубликатов +/- стандартные отклонения (CO).

ММоАК выполняли в соответствии с описанием в примере 6.7. Комбинацию BEAT38/47 + Darzalex применяли с возрастающими дозами как BEAT 38/47, так и Darzalex в концентрациях, указанных на оси X фигуры.

Результаты и выводы

Darzalex является стандартной терапией множественной миеломы, и предполагается, что BEAT 38/47–60 будет использоваться у пациентов с рецидивирующей рефрактерной ММ после лечения Darzalex. Поэтому авторы изобретения оценивали, влияет ли BEAT 38/47–60 на связывание клеток в присутствии Darzalex, а также влияет ли Darzalex на активность BEAT 38/47–60 в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Для точного решения вопросы конкуренции за CD38 авторы изобретения использовали опухолевые клетки CD47-KO Raji для избегания связывания CD47 BEAT 38/47–60. Посредством одновременного инкубирования клеток CD47-KO Raji с BEAT 38/47–60 и Darzalex при 4 °C авторы изобретения обнаружили, что Darzalex не влияет на связывание BEAT 38/47–60 с клетками CD47-KO Raji (Фиг. 20A–C). Дополнительно авторы изобретения обнаружили только низкое (20%) ингибирование связывания BEAT 38/47–60 при инкубировании Darzalex с опухолевыми клетками CD47-KO Raji до окрашивания BEAT 38/47–60 (Фиг. 20D). Для выяснения, влияла ли опосредованная Darzalex низкая конкуренция при связывании клеток на активность BEAT 38/47–60 *in vitro*, авторы изобретения исследовали ADCP-, ADCC- и CDC-активность BEAT 38/47–60 в присутствии Darzalex. В целом авторы изобретения не обнаружили влияния на какую-либо эффекторную функцию BEAT 38/47–60 при сопутствующей обработке Darzalex *in vitro* (Фиг. 21 и таблица 20).

В общем эти данные свидетельствуют о том, что BEAT 38/47–60 может сохранять свою эффективность даже в присутствии связанного Darzalex.

Таблица 20. Значения статистики, рассчитанные с использованием критериев множественного сравнения Тьюки в указанных линиях опухолевых клеток. НЗ = не значимый. Если кривые уничтожения не достигают сравнимого максимального уровня, сравнение EC50 не применимо (НП).

	Условия	Макс. фагоцитоз	EC50
ADCP (CD38 ^{high})	BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	НЗ	НЗ
	BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + BEAT 38/47–60)	НЗ	НЗ
ADCC (CD38 ^{low})	BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	Н/О	Н/О
	BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + BEAT 38/47–60)	НЗ	НЗ
ADCC (CD38 ^{high})	BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	< 0,001	НЗ
	BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + BEAT 38/47–60)	НЗ	НЗ
ADCC (CD38 ^{low})	BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	< 0,01	НЗ
	BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + BEAT 38/47–60)	НЗ	НЗ
CDC (CD38 ^{high})	BEAT 38/47–60 по сравнению с Darzalex	< 0,05	Н/О
	BEAT 38/47–60 по сравнению с (Darzalex + BEAT 38/47–60)	НЗ	< 0,001

20 Пример 7. Оценка *ex vivo* целевых профилей BEAT CD38/47–60

CD47 экспрессируется повсеместно и активируется при некоторых гемобластозах. Для исследования целевой специфичности BEAT CD38/47–60 на неопухолевые клетки, авторы изобретения оценивали их связывание с эритроцитами и тромбоцитами, которые, как известно, имели высокий уровень экспрессии CD47.

Для оценки BEAT CD38/47–60 в качестве партии клинической разработки использовали другую партию молекулы. Несмотря на демонстрацию улучшенной чистоты по сравнению с BEAT CD38/47–60, использованным в предыдущих примерах, обе партии BEAT CD38/47–60 ранней и поздней разработки показали сравнимую функциональность и активность в отношении линий опухолевых клеток.

5

Пример 7.1. BEAT38/47–60 демонстрируют более низкую целевую/внеопухолевую активность в эритроцитах и тромбоцитах по сравнению с 5F9 *in vitro*

Материалы и методы

Связывание BEAT 38/47 и 5F9 с эритроцитами человека (Фиг. 22A)

10 Типичный пример связывания эритроцитов человека BEAT 38/47 или 5F9. На графиках на Фиг. 22A показано наложение кривых связывания нелинейной сигмоидальной регрессии (относительная средняя геометрическая интенсивность флуоресценции) для заданного донора. Связывание оценивали на шести различных донорах эритроцитов человека. Окрашивание клеток выполняли, как описано в примере 6.1.

15 *Способность BEAT 38/47 индуцировать агреггацию эритроцитов (Фиг. 22B) оценивали с использованием непрямого анализа Кумбса*

Приготовление 0,8% раствора крови

Свежую периферическую кровь от здоровых добровольцев, собранную в пробирки К3 с EDTA, получали из центра переливания крови Vermont Transfusion Center. 2 мл свежей крови добавляли к 48 мл стерильного PBS в пробирке Falcon объемом 50 мл. Пробирки центрифугировали 10 мин при 3500 G. Супернатант осторожно удаляли пипеткой на 25 мл.
20 0,8% раствор суспензии эритроцитов готовили посредством добавления 100 мкл эритроцитарной массы в 10 мл ID-Diluent 2 в новой чистой пробирке.

Непрямой тест Кумбса

Затем готовили тестовые и контрольные антитела, 3×-концентрированные в стерильном PBS. 50 мкл крови из 0,8% раствора крови и 25 мкл каждого разведения антител затем добавляли в каждую колонку антител к IgG ID-карты Кумбса. Карты инкубировали при 37°C в течение 15 минут и затем центрифугировали в ID-центрифуге. Каждая микропробирка ID-карты содержит антитела к человеческому глобулину антител к IgG (кролика) внутри гелевой матрицы. Колонка с гелем действует как фильтр, который улавливает агреггированные эритроциты, когда они проходят через колонку с гелем во время центрифугирования карты. Колонка с гелем разделяет агреггированные эритроциты от неагреггированных эритроцитов на основании размера. Все агреггированные эритроциты захватываются в верхней части или вдоль гелевой колонки, а неагреггированные эритроциты опускаются на дно
30

микропробирки, образуя осадок. Степень агглютинации оценивали от 0 (отсутствие агглютинации) до 4 (полная агглютинация).

Анализ истощения эритроцитов (Фиг. 22C)

5 Способность BEAT 38/47 индуцировать потерю эритроцитов оценивали внутри компании с использованием гематологического анализатора (Sigma 5H с кровью человека) (Фиг. 22C). Свежую периферическую кровь от здоровых человеческих добровольцев, собранную в пробирки КЗ с EDTA, получали из центра переливания крови Bem Transfusion Center.

10 Тестовые и контрольные антитела инкубировали в концентрации 13X в 500 мкл цельной периферической крови в течение 1 ч 30 мин при 37 °C при легком перемешивании (100 об/мин). После инкубирования выполняли подсчет клеток крови с использованием гематологического анализатора Sigma 5H (SwissAvans). Затем регистрировали концентрацию эритроцитов в свежей крови и анализировали ее в программном обеспечении GraphPad Prism.

Гемолиз эритроцитов (Фиг. 22D)

15 Свежую периферическую кровь от здоровых добровольцев, собранную в пробирки КЗ с EDTA, получали из центра переливания крови Bem Transfusion Center. Индукцию гемолиза BEAT 38/47 (Фиг. 22D) исследовали *in vitro* посредством инкубирования тестовых и контрольных антител в свежей периферической крови при 37 °C в течение 3 ч 30 мин и анализа абсорбции гемоглобина в плазме при 414 нм. В качестве положительного контроля для гемолиза использовали Triton X-100. Образцы центрифугировали и плазму переносили в 96-луночный планшет с прозрачным дном. Гемолиз количественно определяли посредством измерения абсорбции плазмы при 414 нм. Результаты были нормализованы в программном обеспечении GraphPad Prism относительно условия без обработки антител
20 (отрицательный контроль) и Triton X-100 (положительный контроль).

Агрегация тромбоцитов (Фиг. 22E)

Забор и подготовка крови

25 После письменного информированного согласия кровь получали посредством осторожной венепункции с использованием иглы 19-го калибра и шприца на 60 мл у шести здоровых добровольцев, которые отрицали недавнее употребление нестероидных противовоспалительных средств или других препаратов, которые, как известно, влияют на функцию тромбоцитов. Кровь (общий объем 50 мл) распределяли в градуированные пластиковые пробирки объемом 10 мл, каждая из которых содержала 3,13% (масса/объем) тринатрия цитрата дигидрат (1 часть цитрата на 9 частей крови), и осторожно переворачивали 3 раза для смешивания с антикоагулянтом. После тщательного перемешивания кровь оставляли неподвижно на столе на 10 минут, а затем центрифугировали при 180× g в течение
30 10 минут для приготовления богатой тромбоцитами плазмы (PRP). PRP осторожно аспирировали пластиковой пипеткой, переносили в стерильный пластиковый универсальный контейнер емкостью 30 мл. Некоторое количество остаточной крови центрифугировали дополнительно (3000 g в течение 10 мин) для получения обедненной

тромбоцитами плазмы (PPP), требуемой для установки 100% световой трансмиссионной агрегометрии (LTA) на агрегометре AggRAM.

Процедура LTA

Агрегометр AggRAM использовали в соответствии с инструкциями производителя. Перед началом эксперимента прибор предварительно прогревали до 37 °C. Для каждого отдельного образца (кривая агрегации) устанавливали 100% оптическую светопрозрачность с использованием 250 мкл образца аутологической PPP. После этого в кювету, содержащую мешалку, добавляли 215 мкл PRP и 25 мкл исследуемых соединений или LeoA1 добавляли к образцу, который затем помещали в лунку для нагревания AggRAM на 2 минуты без перемешивания. Через 1 минуту кювету перемещали в оптическую лунку AggRAM с перемешиванием, в которой светопрозрачность устанавливали на регистрацию в течение дополнительной минуты, для определения исходного показателя прозрачности 0% перед добавлением 10 мкл коллагена, аденозиндифосфата (АДФ) или PBS. Реакцию агрегации регистрировали еще в течение 6 минут. Следы агрегации, демонстрирующие изменения светопрозрачности, и отчеты для каждого цикла распечатывали непосредственно с агрегометра. Печатные копии необработанных данных для всех отдельных добровольцев хранились в специально отведенном надежном месте в Platelet Services и могут быть предоставлены по запросу. Числовые выходные данные (AUC и % Max) взяты непосредственно с аппарата и представлены в табличной форме в отчете Platelet Services, и отображены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты и выводы

CD38 и CD47, хотя и стимулируются в клетках множественной миеломы, могут на низком уровне экспрессироваться в других тканях и клеточных компартментах, включая эритроциты, тромбоциты и некоторые лейкоциты. В частности, особо удобную мишень для воздействия терапевтических средств на основании антител к CD47 представляют эритроциты человека вследствие их высокой базальной экспрессии CD47. Более того, основным побочным эффектом маглолимаба у примерно 60% пациентов в клиническом испытании фазы I была транзиторная анемия (SIKIC, B. I. ET AL. First-in-Human, First-in-Class Phase I Trial of the Anti-CD47 Antibody Hu5F9-G4 in Patients With Advanced Cancers. J Clin Oncol 37, 946–953, 2019). На этом основании BEAT 38/47–60 выполнены с наличием низкоаффинного плеча Fab анти-CD47 для снижения риска эритроцитов на мишени, индуцированных монотерапией анти-CD47, такими как высокоаффинное анти-CD47 маглолимаб. Поэтому авторы изобретения исследовали несколько целевых/внеопухолевых параметров BEAT 38/47–60 *in vitro* по сравнению с маглолимаб-подобным моноклональным антителом. Авторы изобретения анализировали связывание с эритроцитами и субпопуляциями клеток цельной крови, индукцию гемагглютинации, истощение эритроцитов и гемолиз, а также агрегацию тромбоцитов (Фиг. 22).

BEAT 38/47–60 продемонстрировали заметно более низкое связывание с эритроцитами по сравнению с маглолимабом (5F9) в цельной крови, инкубированной с возрастающей концентрацией антител (Фиг. 22A), что позволяет предположить более благоприятную нацеленность на эритроциты. Это согласуется с его более низкой аффинностью к CD47 по сравнению с маглолимабом. Для оценки того, является ли более низкий целевой эффект на эритроциты результатом более низкого связывания эритроцитов, авторы изобретения исследовали возможное влияние BEAT 38/47–

- 60 на гемагглютинацию, гемолиз и истощение эритроцитов. Для получения надежного и воспроизводимого показателя агглютинации эритроцитов *in vitro* авторы изобретения подготовили анализ Кумбса, метод, который при перекрестном связывании антител, связанных на эритроцитах, опосредованно вызывает агглютинацию. Использование этого метода. Маглолимаб индуцировал заметную гемагглютинацию эритроцитов *in vitro*, тогда как BEAT 38/47–60 индуцировали более низкую по сравнению с ним оценку Кумбса (Фиг. 22B). Дополнительно, используя гематоанализатор для подсчета эритроцитов, авторы изобретения обнаружили, что инкубирование цельной крови с BEAT 38/47–60 не индуцирует обнаруживаемого истощения эритроцитов в цельной крови (Фиг. 22C). Наоборот, маглолимаб-подобные антитела индуцировали дозозависимое истощение эритроцитов в цельной крови (Фиг. 22C). Как BEAT 38/47–60, так и маглолимаб-подобные антитела не вызывали обнаруживаемого лизиса эритроцитов *in vitro* (Фиг. 22D). Затем оценивали влияние BEAT 38/47–60 на агрегацию тромбоцитов *in vitro*. Leao-1, хорошо зарекомендовавшее себя антитело, индуцирующее агрегацию тромбоцитов (JUDITH L. SCOTT at al. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. J Biol Chem. 1989 Aug 15;264(23):13475–82), использовали в качестве положительного контроля. Соответственно, оно индуцировало высокий уровень агрегации тромбоцитов (Фиг. 22E). Наоборот, BEAT 38/47–60 или маглолимаб-подобное антитело не индуцировало агрегацию тромбоцитов (Фиг. 22E).
- 15 В целом эти данные свидетельствуют о том, что BEAT 38/47–60 имеют более благоприятный профиль нацеленности на эритроциты по сравнению с маглолимаб-подобным антителом к CD47.

Таблица 21. Значения статистики, рассчитанные с использованием критериев множественного сравнения Тьюки в упомянутых условиях оценки Кумбса.

	Условия	EC50
Оценка Кумбса	BEAT 38/47–60 по сравнению с 5F9	< 0,0001

- 20 **Пример 7.2. BEAT38/47–60 демонстрируют более низкую целевую/внеопухолевую активность в эритроцитах и тромбоцитах по сравнению с 5F9 *in vitro***

Материалы и методы

Связывание оценивали на шести различных донорах эритроцитов человека. Окрашивание клеток проводили в соответствии с описанием на Фиг. 11.

- 25 Результаты и выводы

Затем авторы изобретения анализировали уровень связывания BEAT 38/47–60 в цельной крови, поскольку CD47 и CD38 могут экспрессироваться на множестве субпопуляций лейкоцитов. Связывание BEAT 38/47–60 и маглолимаб-подобного антитела с иммунными клетками сравнивали с помощью проточной цитометрии после окрашивания цельной крови от здоровых доноров. BEAT 38/47–60 демонстрировало тенденцию к более низкому связыванию с субпопуляциями Т-клеток CD4 и CD8, В-клетками и NK-клетками по сравнению с 5F9. Связывание с гранулоцитами

30

было единственным исключением, когда BEAT 38/47–60 демонстрировал тенденцию к более высокому уровню связывания при самых высоких исследуемых концентрациях (Фиг. 23).

В целом эти данные свидетельствуют о том, что BEAT 38/47–60 не демонстрирует значительной уязвимости по измерениям его профиля нацеленности на цельную кровь по сравнению с маглолимаб-подобным антителом к CD47.

5 Пример 8. Эффективность моделей BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 *in vivo*

Пример 8.1. Эффективность BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 в мышинной модели опухоли Raji, экспрессирующей высокий уровень CD38, *in vivo*

Материал и метод

10 *Содержание животных*

Эксперименты *in vivo* проводились на самках 6–7-недельных иммунокомпетентных мышей SCID от JANVIER LABS. Всех мышей содержали в стандартных условиях окружающей среды в клетках для грызунов (комнатная температура 20 ± 1 °C, относительная влажность $50 \pm 10\%$, 12-часовой световой цикл). Мыши получали облученную пищу и подстилку и питьевую воду, фильтрованную через фильтр 0,22 мкм. Исследования проводились совместно с
15 компанией Transcure (ФРАНЦИЯ).

Модель опухоли Raji мышей с высоким уровнем экспрессии CD38

Было проведено два эксперимента, которые были названы соответственно исследованиями Raj_9 и Raj_10.

Исследование Raj_9. Повышение дозы BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 при опухолях Raji. Мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки Raji только в день 0 (по 5 мышей в группе; 8 групп; всего
20 40 мышей). Через 12 дней после ксенотрансплантации мышей рандомизировали в зависимости от объема опухоли и внутривенно вводили PBS1X; молекулы BEAT CD38/CD47–48 в дозах 10, 1 и 0,1 мг/кг и молекулы BEAT CD38/CD47–60 в дозах 10, 1 и 0,1 мг/кг один раз в неделю в течение 3 недель. Анализ *ex vivo* на этих животных не проводили. Этот эксперимент проводили только один раз.

Исследование Raj_10. Исследование эффективности BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 при опухолях Raji.
25 Мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки Raji только в день 0 (по 10 мышей в группе; 8 групп; всего 80 мышей). Через 12 дней после ксенотрансплантации мышей рандомизировали в зависимости от объема опухоли и внутривенно вводили PBS1X; молекулы BEAT CD38/CD47–48; молекулы BEAT CD38/CD47–60; молекулы BEAT CD38/CD47–59; молекулы BEAT CD38/CD47–79 один раз в неделю в течение 3 недель. Darzalex вводили внутривенно в дозе 16 мг/кг два раза в неделю в течение 3 недель. Анализ *ex vivo* выполняли на 5 животных
30 в группе в день 16. Сыворотку и опухоли мышей собирали для анализа *ex vivo*. Luminescence выполняли на образцах

сыворотки мышей и супернатанта опухоли. На опухолях мышей выполняли анализ FACS. Этот эксперимент проводили только один раз.

Ингибирование роста опухоли рассчитывают с использованием метода $1-\Delta t/\Delta c$ (изменение размера анализируемой опухоли, деленное на изменение в размере контрольной опухоли) и выражают в процентах. Для этого расчета 5 использованы средние значения для каждой группы);

$$TGI = (1 - (\text{лечение } V_{\text{current}} - \text{лечение } V_{\text{start}}) / (\text{контроль } V_{\text{current}} - \text{контроль } V_{\text{start}})) \times 100 \text{ как } \%$$

Регрессию опухоли определяли как достижение отрицательного Δt .

Подготовка образцов мышей для проточной цитометрии

Для образцов опухолей опухоли собирали и разделяли с помощью GentleMACS. Суспензии клеток фильтровали и центрифугировали. Затем клетки подсчитывали и окрашивали для определения профиля иммунных клеток. Окрашивание с использованием полной панели антител и относительного контроля готовили в буфере для FACS. Образцы анализировали на приборе Northern lights (CYTEK). Данные анализировали с использованием FlowJo v10.7.1 и GraphPad Prism 8.

Подготовка образцов мышей для анализа Luminex

15 Образцы сыворотки и образцы супернатанта опухоли оценивали посредством количественного определения Multiplex Luminex в соответствии с инструкциями производителя. Гранулы, образцы *in vivo* и/или супернатанты и разбавленные стандарты, входящие в набор, добавляли на планшеты и инкубировали в течение ночи. К планшетам добавляли антитело для обнаружения и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали, добавляли стрептавидин-PE и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли буфер считывания, и инкубировали при комнатной температуре перед считыванием прибором Luminex 200. 20 Данные Luminex анализировали с использованием программного обеспечения ProcartaPlex 1.0 Analyst. Концентрацию цитокинов нормализовали к верхнему (ULOQ) и нижнему (LLOQ) пределам количественного определения. Все данные ниже LLOQ были установлены на самую низкую точку стандартных кривых и считались непригодными для анализа (для анализа GraphPad Prism ноль не допускается). Данные анализировали с использованием Excel и GraphPad 25 Prism 8.

Статистический анализ

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9. Выполнен статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и, в случае его значимости, — с последующим анализом Даннетта с контролем PBS и множественным сравнением Тьюки, $P < 0,05$ считали статистически значимым. Уровень 30 значимости указан звездочками. (***) для $< 0,0001$; (***) для $0,0001$; ** для $0,001$ и * для $0,05$).

Результаты и выводы

BEAT CD38/CD47-48 и BEAT CD38/CD47-60 оценивали в эксперименте дозозависимого ответа *in vivo* в модели ксенотрансплантата (CDX), полученной из линии опухолевых клеток Raji, эта линия опухолевых клеток экспрессирует высокие уровни CD38 и, как сообщается, дает ответ на Darzalex (YU et al, Novel anti-CD38 humanized mAb SG003 possessed enhanced cytotoxicity in lymphoma than Daratumumab via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. BMC Biotechnology (2019) 19:28). Мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки Raji только в день 0 (по 5 мышей в группе; 8 групп; всего 40 мышей). Через 12 дней после ксенотрансплантации мышей рандомизировали в зависимости от объема опухоли и раз в неделю в течение 3 недель внутривенно вводили PBS, молекулы BEAT CD38/CD47-48 в дозах 10,1 и 0,1 мг/кг и молекулы BEAT CD38/CD47-60 в дозах 10,1 и 0,1 мг/кг. Объемы опухоли при включении варьировались от 40 до 270 мм³. Из дальнейшей оценки исключали 3 мышей с опухолью, не поддающейся измерению в Д12.

Через 15 дней после начала лечения (27 дней после ксенотрансплантации) контрольные опухоли достигали этической конечной точки 1000 мм³, и исследование останавливали. Ингибирование роста опухоли оценивали для обеих молекул во всех 3 дозах. Регрессия опухоли во время лечения наблюдалась у 3/5 мышей, получавших лечение BEAT CD38/CD47-48, и у 4/5 мышей, получавших лечение BEAT CD38/CD47-60. Рост опухоли показан на Фиг. 24 и Фиг. 25. На основании числа регрессий 10 мг/кг определили как эффективную дозу. Односторонний дисперсионный анализ в Д27 не был значимым в связи с высокой вариабельностью объемов опухоли, и апостериорный тест не проводили.

Эффективность BEAT CD38/CD47-48 и BEAT CD38/CD47-60 в дозе 10 мг/кг исследовали в одном дополнительном эксперименте *in vivo* на модели опухоли Raji. В день 0 мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки Raji (по 10 мышей в группе; 8 групп; всего 80 мышей). Через 12 дней после ксенотрансплантации мышей рандомизировали в зависимости от объема опухоли и внутривенно вводили PBSIX; молекулы BEAT CD38/CD47-48; молекулы BEAT CD38/CD47-60; молекулы BEAT CD38/CD47-59 (контроль CD38 с одним плечом для BEAT CD38/CD47-48) и молекулы BEAT CD38/CD47-79 (контроль CD38 с одним плечом для BEAT CD38/CD47-60) один раз в неделю в течение 3 недель. Все молекулы BEAT вводили в дозе 10 мг/кг. Darzalex вводили внутривенно в дозе 16 мг/кг два раза в неделю в течение 3 недель. Анализы *ex vivo* выполняли на 5 животных в группе в день 16. Сыворотку и опухоли мышей собирали для анализа *ex vivo*. Lumiplex выполняли на образцах сыворотки мышей и супернатанта опухоли. На опухолях мышей выполняли анализ FACS.

Через 36 дней после ксенотрансплантации контрольные мыши имели опухоли, превышающие 1000 мм³, и исследование прерывали. Рассчитывали ингибирование роста опухоли (TGI), все BEAT и Darzalex продемонстрировали значимое TGI в диапазоне от 47% до 110% (регрессия) (таблица 22). Оба из BEAT CD38/CD47-48 и BEAT CD38/CD47-60 продемонстрировали значимую эффективность в отношении уменьшения опухоли (Фиг. 26, Фиг. 27 и Фиг. 28 и таблица 22).

Таблица 22. Статистический анализ в день 36 Фиг. 26, Фиг. 27 и Фиг. 28 (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением Даннетта). Показано TGI (ингибирование роста опухоли).

Критерий Даннетта для множественных сравнений	Среднее дифф.,	95,00% ДИ дифф.,	Значимый?	Изложение сущности изобретения	Скорректированное Р-значение	TGI
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-48	1124	От 775,1 до 1472	Да	****	< 0,0001	110%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-59	716,6	От 368,1 до 1065	Да	****	< 0,0001	70%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-60	982,8	От 634,3 до 1331	Да	****	< 0,0001	96%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-79	922,2	От 573,7 до 1271	Да	****	< 0,0001	91%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с Darzalex	479	От 130,5 до 827,5	Да	**	0,0038	47%

Регрессии достигали у 5/5 мышей, получавших BEAT CD38/CD47-48 Регрессии достигали у 3/5 мышей, получавших BEAT CD38/CD47-60, тогда как Darzalex не демонстрировал регрессию ни у одной из них, и, как показано в таблице 23, апостериорное тестирование Тьюки не продемонстрировало различий между BEAT CD38/CD47-48 BEAT и CD38/CD47-60. В день 36 в этой схеме эксперимента BEAT CD38/CD47-48 и BEAT CD38/CD47-60 продемонстрировали лучшую эффективность, чем Darzalex (соответственно $P = 0,0003$ и $P = 0,0076$) (таблица 23).

Таблица 23. Статистический анализ в день 36 Фиг. 26, Фиг. 27 и Фиг. 28 (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением Тьюки).

Критерий Тьюки для множественных сравнений	Среднее дифф.,	95,00% ДИ дифф.,	Значимый?	Изложение сущности изобретения	Скорректированное Р-значение
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-48	1124	От 714,9 до 1532	Да	****	< 0,0001

Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-59	716,6	От 307,9 до 1125	Да	****	< 0,0001
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-60	982,8	От 574,1 до 1392	Да	****	< 0,0001
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47-79	922,2	От 513,5 до 1331	Да	****	< 0,0001
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с Darzalex	479	От 70,29 до 887,7	Да	*	0,0127
BEAT CD38/47-48 по сравнению с BEAT CD38/47-59	-407	От -815,7 до 1,713	Нет	НЗ	0,0516
BEAT CD38/47-48 по сравнению с BEAT CD38/47-60	-140,8	От -549,5 до 267,9	Нет	НЗ	0,9485
BEAT CD38/47-48 по сравнению с BEAT CD38/47-79	-201,4	От -610,1 до 207,3	Нет	НЗ	0,749
BEAT CD38/47-48 по сравнению с Darzalex	-644,6	От -1053 до -235,9	Да	***	0,0003
BEAT CD38/47-59 по сравнению с BEAT CD38/47-60	266,2	От -142,5 до 674,9	Нет	НЗ	0,4304
BEAT CD38/47-59 по сравнению с BEAT CD38/47-79	205,6	От -203,1 до 614,3	Нет	НЗ	0,7296
BEAT CD38/47-59 по сравнению с Darzalex	-237,6	От -646,3 до 171,1	Нет	НЗ	0,5715
BEAT CD38/47-60 по сравнению с BEAT CD38/47-79	-60,6	От -469,3 до 348,1	Нет	НЗ	0,9997
BEAT CD38/47-60 по сравнению с Darzalex	-503,8	От -912,5 до -95,09	Да	**	0,0076

BEAT CD38/47–79 по сравнению с Darzalex	-443,2	От -851,9 до -34,49	Да	*	0,026
-----------------------------------------	--------	---------------------	----	---	-------

5 Через 15 дней после введения ксенотрансплантата (3 дня после первого введения) 5 животных на группу были умерщвлены. Сыворотку и опухоли мышей собирали и анализировали *ex vivo* с помощью Lumiplex и FACS. BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 продемонстрировали тенденцию к снижению уровня IL-1b в опухолях (Фиг. 29А). BEAT CD38/CD47–60 продемонстрировали значимое снижение макрофагов MHCII+ в опухолях (Фиг. 29В и таблица 24).

Таблица 24. Статистический анализ Фиг. 29В (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением Даннетта).

Критерий Даннетта для множественных сравнений	Среднее дифф.,	95,00% ДИ дифф.,	Значимый?	Изложение сущности изобретения	Скорректированное Р-значение
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48	91691	От -79161 до 262544	Нет	НЗ	0,532
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–59	210665	От 39812 до 381518	Да	*	0,0106
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60	199452	От 28599 до 370305	Да	*	0,0166
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–79	126510	От -54707 до 307727	Нет	НЗ	0,2696
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с Darzalex	62652	От -108200 до 233505	Нет	НЗ	0,8491

10

В заключение, BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 при 10 мг/кг продемонстрировали значимую эффективность в уменьшении опухоли в модели ксенотрансплантата Raji на мышах. BEAT CD38/CD47–60 продемонстрировало соответствующую активацию макрофагов, согласующуюся с ADCP.

Пример 8.2. Эффективность BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 в мышинной модели опухоли KIVIS-12-ВМ мышей, экспрессирующей низкий уровень CD38, *in vivo*

Материал и метод

Содержание животных

5 Эксперименты *in vivo* проводились на самках 6–7-недельных иммунокомпетентных мышей SCID от JANVIER LABS. Всех мышей содержали в стандартных условиях окружающей среды в клетках для грызунов (комнатная температура 20 ± 1 °C, относительная влажность $50 \pm 10\%$, 12-часовой световой цикл). Мыши получали облученную пищу и подстилку и питьевую воду, фильтрованную через фильтр 0,22 мкм. Исследования проводились совместно с компанией Transcure (ФРАНЦИЯ).

10 *Модель опухоли KMS-12-ВМ мышей, резистентная к Darzalex*

Эксперимент проводился однократно и получил название «исследование KMS_7».

Исследование KMS_7. Повышение дозы BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 при опухолях KMS-12-ВМ. Только в день 0 мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки KMS-12-ВМ (по 5 мышей в группе; 9 групп; всего 45 мышей). Через 15 дней после ксенотрансплантации мышей рандомизировали в зависимости от объема опухоли и внутривенно вводили PBS 1X; молекулы BEAT CD38/CD47–48 в дозах 10, 1 и 0,1 мг/кг и молекулы BEAT CD38/CD47–60 в дозах 10, 1 и 0,1 мг/кг один раз в неделю в течение 3 недель. Darzalex вводили внутривенно в дозе 16 мг/кг два раза в неделю в течение 3 недель. Анализ *ex vivo* на этих животных не проводили. Этот эксперимент проводили только один раз.

20 Ингибирование роста опухоли рассчитывают с использованием метода $1 - \Delta t / \Delta c$ (изменение размера анализируемой опухоли, деленное на изменение в размере контрольной опухоли) и выражают в процентах. Для этого расчета использованы средние значения для каждой группы):

$$TGI = (1 - (\text{лечение } V_{\text{current}} - \text{лечение } V_{\text{start}}) / (\text{контроль } V_{\text{current}} - \text{контроль } V_{\text{start}})) \times 100 \text{ как } \%$$

Регрессию опухоли определяли как достижение отрицательного Δt (в конце исследования опухоль меньше, чем в начале).

25 *Статистический анализ*

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9. Выполнен статистический анализ: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) роста опухоли и, в случае его значимости, — с последующим анализом Даннетта с контролем PBS и множественным сравнением Тьюки, $P < 0,05$ считали статистически значимым. Уровень значимости указан звездочками. (**** для $< 0,0001$; *** для $0,0001$; ** для $0,001$ и * для $0,05$).

Результаты и выводы

5 BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 исследовали в эксперименте *in vivo* в модели опухоли KMS-12-BM, экспрессирующей низкие уровни CD38. В день 0 мышам SCID подкожно ксенотрансплантировали опухолевые клетки KMS-12-BM (по 5 мышей в группе; 9 групп; всего 45 мышей). Через 15 дней после ксенотрансплантации мышей
 10 рандомизировали в зависимости от объема опухоли и раз в неделю в течение 3 недель внутривенно вводили PBS, молекулы BEAT CD38/CD47–48 в дозах 10,1 и 0,1 мг/кг и молекулы BEAT CD38/CD47–60 в дозах 10,1 и 0,1 мг/кг. Darzalex вводили внутривенно в дозе 16 мг/кг два раза в неделю в течение 3 недель.

В конце запланированного 3-недельного лечения в день 37 отслеживали рост опухоли и оценивали ингибирование роста опухоли (Фиг. 30 и Фиг. 31). Контрольные опухоли выросли в среднем на 300 мм³ и ингибирование роста
 10 опухоли варьировалось от -37% (прогрессирование быстрее, чем в контроле, хотя оно не было значимым) для Darzalex до 86% ингибирования роста опухоли для BEAT CD38/CD47–48 в дозе 10 мг/кг (таблица 25). При самой высокой дозе (10 мг/кг) как BEAT CD38/CD47–48, так и BEAT CD38/CD47–60 статистически превосходили лечение PBS и Darzalex (таблица 25 и таблица 26). В день 37 не было статистических различий между BEAT CD38/CD47–48 и BEAT CD38/CD47–60 (таблица 25 и таблица 26).

15 Таблица 25. Статистический анализ в день 37 Фиг. 30 и Фиг. 31.

Критерий Даннетта для множественных сравнений	Среднее дифф.	95,00% ДИ дифф.,	Значим.	Изложение сущности изобретения	Скорректированное Р-значение	TGI
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг	258	От 56,97 до 459,0	Да	**	0,0073	86%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг	72,6	От -128,4 до 273,6	Нет	НЗ	0,856	24%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 10 мг/кг	63,4	От -137,6 до 264,4	Нет	НЗ	0,9169	21%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 1 мг/кг	223,2	От 22,17 до 424,2	Да	*	0,0244	74%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 1 мг/кг	9,2	От -191,8 до 210,2	Нет	НЗ	0,9998	3%

Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 0,1 мг/кг	55,2	От -145,8 до 256,2	Нет	НЗ	0,9559	18%
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-109,6	От -310,6 до 91,43	Нет	НЗ	0,5143	-37%

В день 55 в этой схеме эксперимента BEAT CD38/CD47–48 продемонстрировало лучшую эффективность, чем Darzalex ($P = 0,0478$) (таблица 26).

5 Таблица 26. Статистический анализ в день 55 Фиг. 30 и Фиг. 31.

Критерий Тьюки для множественных сравнений	Среднее дифф.	95,00% ДИ дифф.,	Значим.	Изложение сущности изобретения	Скорректированное Р-значение
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг	258	От 22,21 до 493,8	Да	*	0,024
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг	72,6	От -163,2 до 308,4	Нет	НЗ	0,9715
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг	63,4	От -172,4 до 299,2	Нет	НЗ	0,9876
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 10 мг/кг	223,2	От -12,59 до 459,0	Нет	НЗ	0,0741
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 1 мг/кг	9,2	От -226,6 до 245,0	Нет	НЗ	> 0,9999
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с BEAT CD38/47–60 в дозе 0,1 мг/кг	55,2	От -180,6 до 291,0	Нет	НЗ	0,9941
Мыши, получавшие PBS, по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-109,6	От -345,4 до 126,2	Нет	НЗ	0,7988
BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг	-185,4	От -421,2 до 50,39	Нет	НЗ	0,2128
BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг	-194,6	От -430,4 до 41,19	Нет	НЗ	0,1678

BEAT CD38/47-48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг	-34,8	От -270,6 до 201,0	Нет	НЗ	0,9997
BEAT CD38/47-48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг	-248,8	От -484,6 до -13,01	Да	*	0,0327
BEAT CD38/47-48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг	-202,8	От -438,6 до 32,99	Нет	НЗ	0,1343
BEAT CD38/47-48 в дозе 10 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-367,6	От -603,4 до -131,8	Да	***	0,0004
BEAT CD38/47-48 в дозе 1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-48 в дозе 0,1 мг/кг	-9,2	От -245,0 до 226,6	Нет	НЗ	> 0,9999
BEAT CD38/47-48 в дозе 1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг	150,6	От -85,19 до 386,4	Нет	НЗ	0,455
BEAT CD38/47-48 в дозе 1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг	-63,4	От -299,2 до 172,4	Нет	НЗ	0,9867
BEAT CD38/47-48 в дозе 1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг	-17,4	От -253,2 до 218,4	Нет	НЗ	> 0,9999
BEAT CD38/47-48 в дозе 1 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-182,2	От -418,0 до 53,59	Нет	НЗ	0,2304
BEAT CD38/47-48 в дозе 0,1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг	159,8	От -75,99 до 395,6	Нет	НЗ	0,3809
BEAT CD38/47-48 в дозе 0,1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг	-54,2	От -290,0 до 181,6	Нет	НЗ	0,9947
BEAT CD38/47-48 в дозе 0,1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг	-8,2	От -244,0 до 227,6	Нет	НЗ	> 0,9999
BEAT CD38/47-48 в дозе 0,1 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-173	От -408,8 до 62,79	Нет	НЗ	0,2865

BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг	-214	От -449,8 до 21,79	Нет	НЗ	0,0975
BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг	-168	От -403,8 до 67,79	Нет	НЗ	0,3204
BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-332,8	От -568,6 до -97,01	Да	**	0,0016
BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг по сравнению с BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг	46	От -189,8 до 281,8	Нет	НЗ	0,9981
BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-118,8	От -354,6 до 117,0	Нет	НЗ	0,7281
BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг по сравнению с Darzalex в дозе 16 мг/кг	-164,8	От -400,6 до 70,99	Нет	НЗ	0,3433

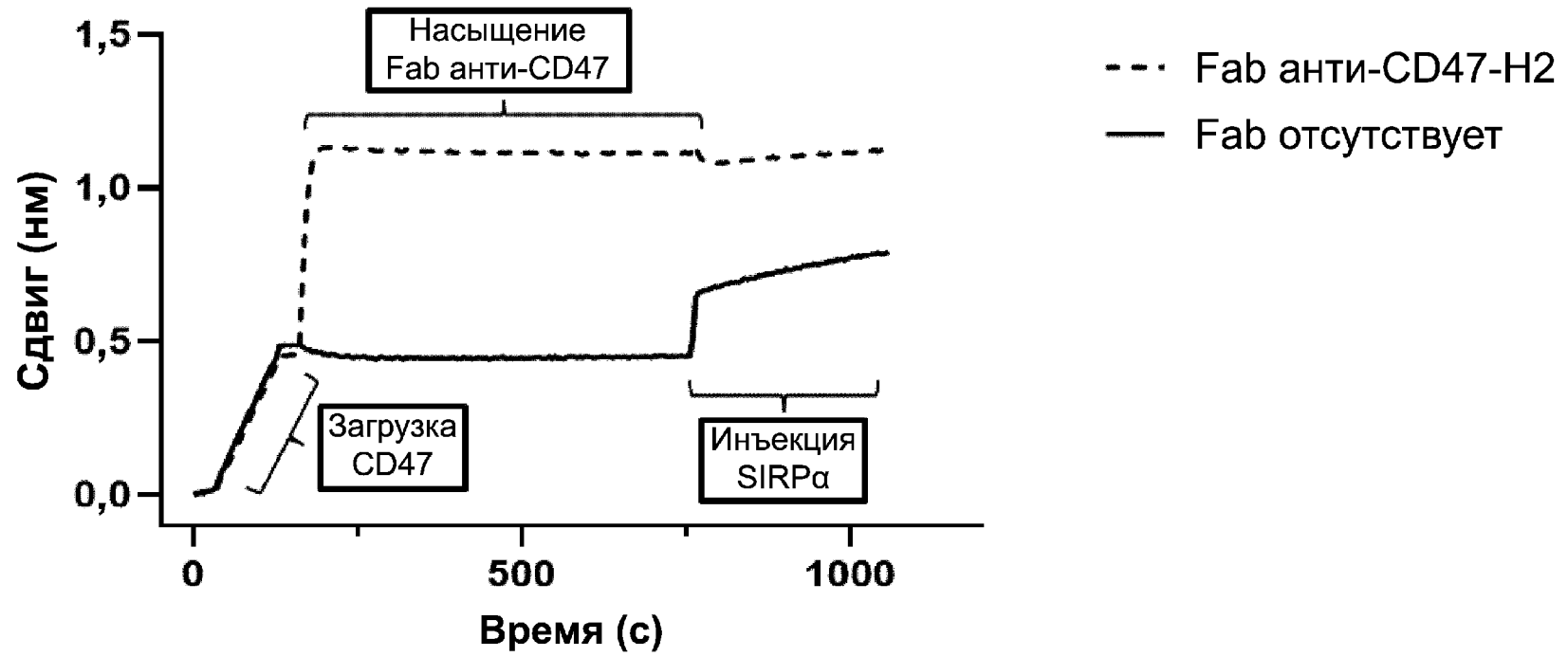
В заключение, BEAT CD38/CD47-48 и BEAT CD38/CD47-60 в дозе 10 мг/кг продемонстрировали эффективность и ингибирование роста опухоли на 86% и 74% соответственно по сравнению с контролем PBS.

Формула изобретения

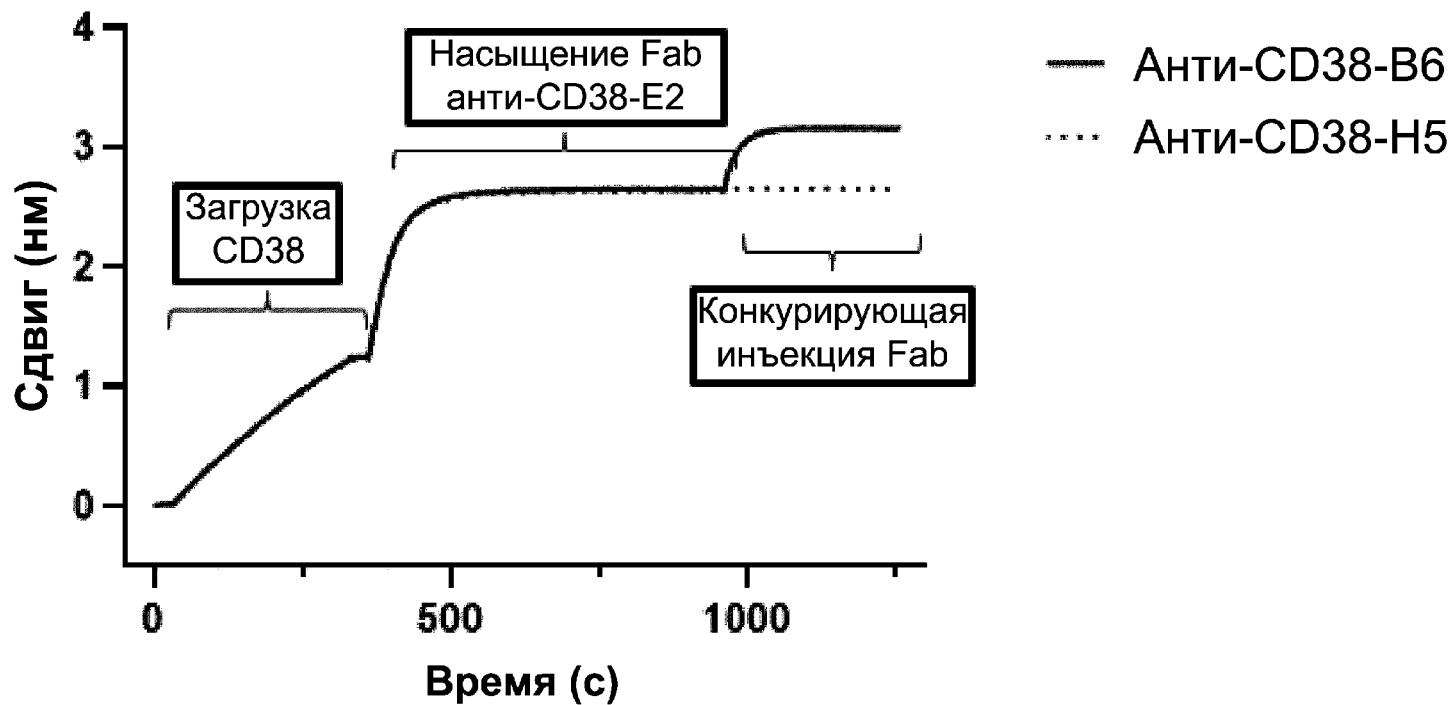
1. Биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере два связывающих участка, по меньшей мере один из которых связывается с CD38 человека и по меньшей мере один из которых связывается с CD47 человека.
- 5 2. Биспецифическое антитело по п. 1, содержащее по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, и по меньшей мере два связывающих участка, которые связываются с CD38 человека.
3. Биспецифическое антитело по п. 2, в котором указанные по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются монопаратопными.
- 10 4. Биспецифическое антитело по п. 2, в котором указанные по меньшей мере два участка, связывающих CD38, являются бипаратопными.
5. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1–4, в котором по меньшей мере один из указанных связывающих участков, который связывается с CD47 человека, может также связываться с CD47 яванского макака.
- 15 6. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1–5, в котором по меньшей мере один из указанных связывающих участков, который связывается с CD38 человека, может также связываться с CD38 яванского макака.
7. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1–6 для применения в качестве лекарственного средства.
- 20 8. Биспецифическое антитело по п. 7 для применения при лечении множественной миеломы, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, рака молочной железы, такого как Her2-положительный рак молочной железы, рака предстательной железы, рака шейки матки, лимфомы В-клеток герминативного центра или острого В-клеточного лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), высокозлокачественной серозной карциномы яичников, перитонеального рака.
- 25 9. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1–8, в котором указанный по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD38 человека, содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR), выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 223; SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 237; SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 241.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1–7, в котором указанный по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, содержит набор CDR, включающий: SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 195.
11. Биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое содержит область Fc.
- 5 12. Биспецифическое антитело по п. 11, в котором указанная область Fc представляет собой вариант, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с областью Fc исходного антитела, причем антитело, содержащее вариантную область Fc, демонстрирует измененную эффекторную функцию по сравнению с исходным антителом.
- 10 13. Биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один связывающий участок, который связывается с CD47 человека, обладает аффинностью к CD47 человека меньше аффинности указанного по меньшей мере одного связывающего участка, который связывается с CD38 человека, к CD38 человека.
14. Эпитоп внеклеточного домена CD38 человека, который связан биспецифическим антителом по любому из пп. 1–13.
- 15 15. Эпитоп внеклеточного домена CD47 человека, который связан биспецифическим антителом по любому из пп. 1–13.
16. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по любому из пп. 1–13.
17. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 16.

ФИГ. 1



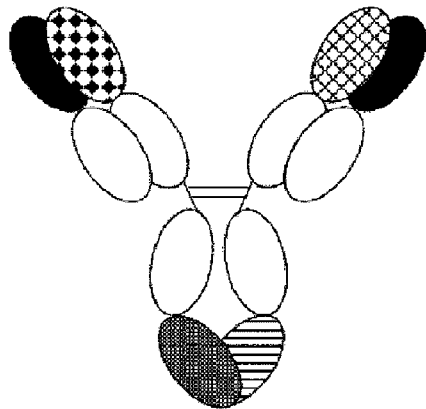
ФИГ. 2



ФИГ. 3

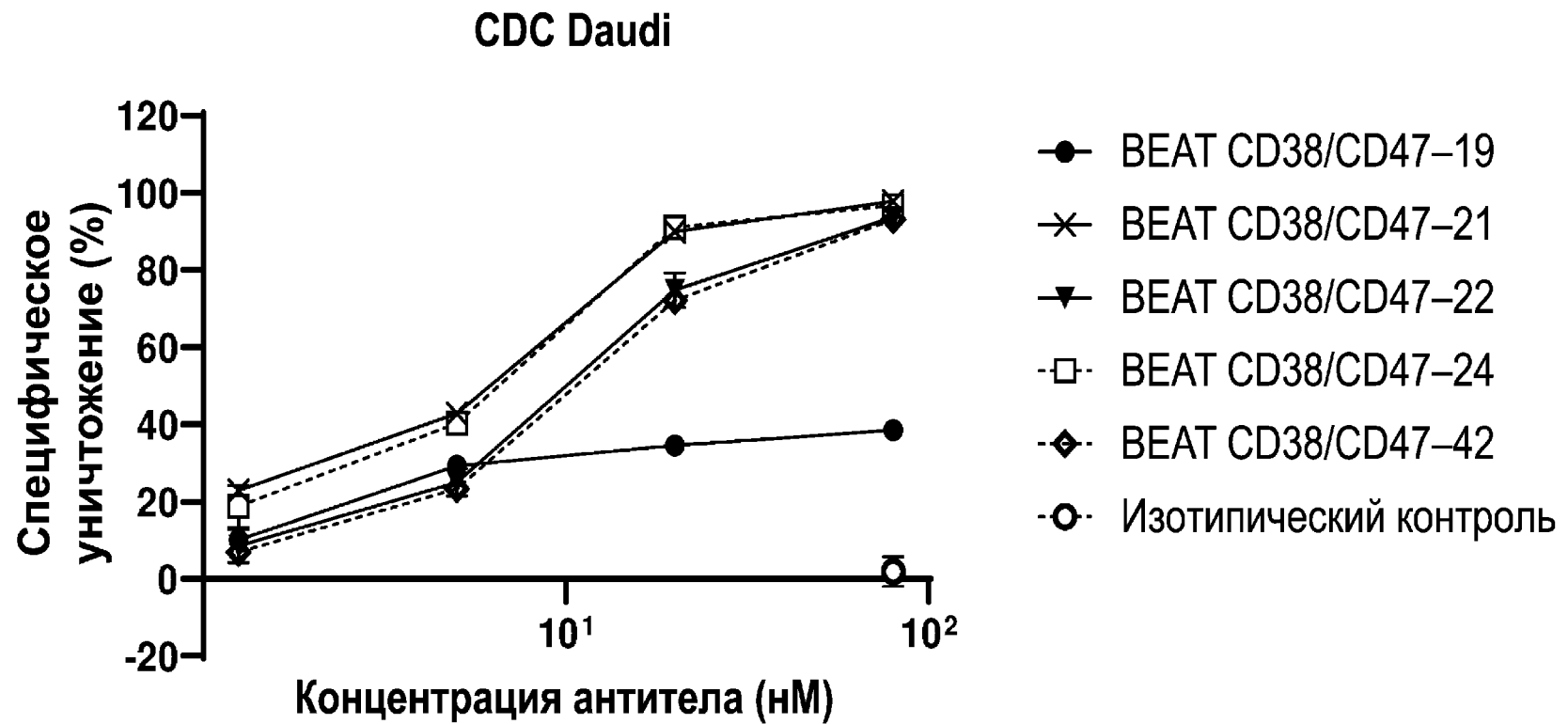
Анти-CD47

Анти-CD38



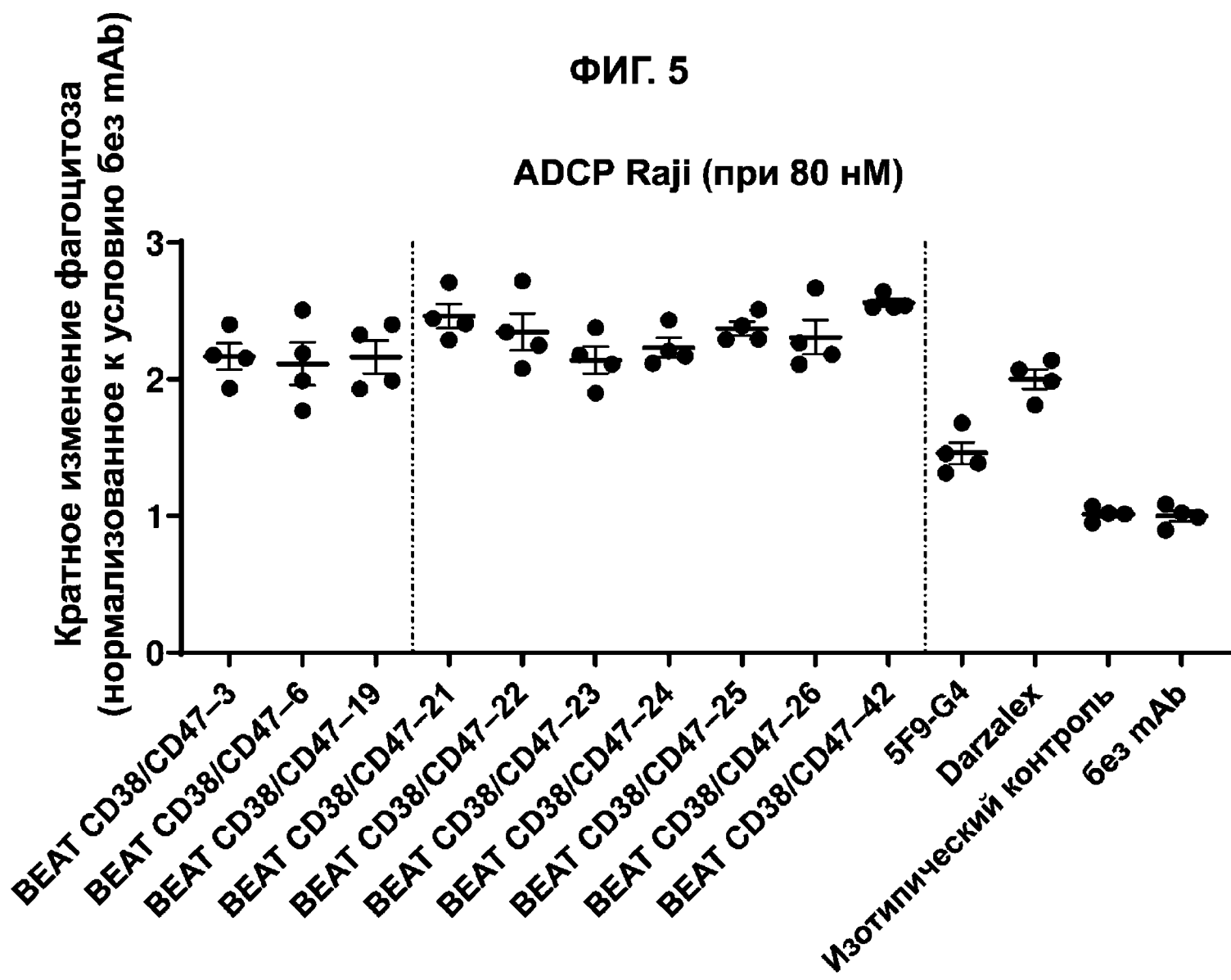
- IgG3 BEAT(A) CH3 [A(-)]
- IgG1 BEAT(B) CH3 [A(+)]
- IgG1
- VL cLc

ФИГ. 4

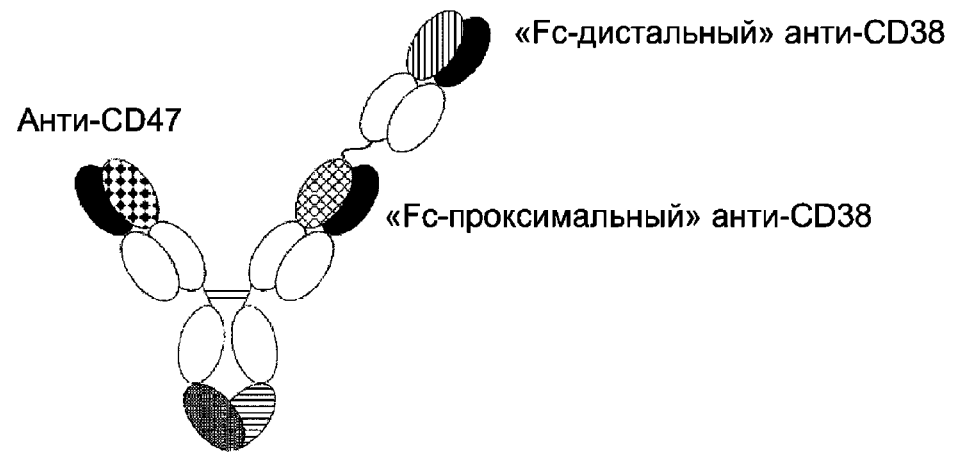


ФИГ. 5

ADCP Raji (при 80 нМ)

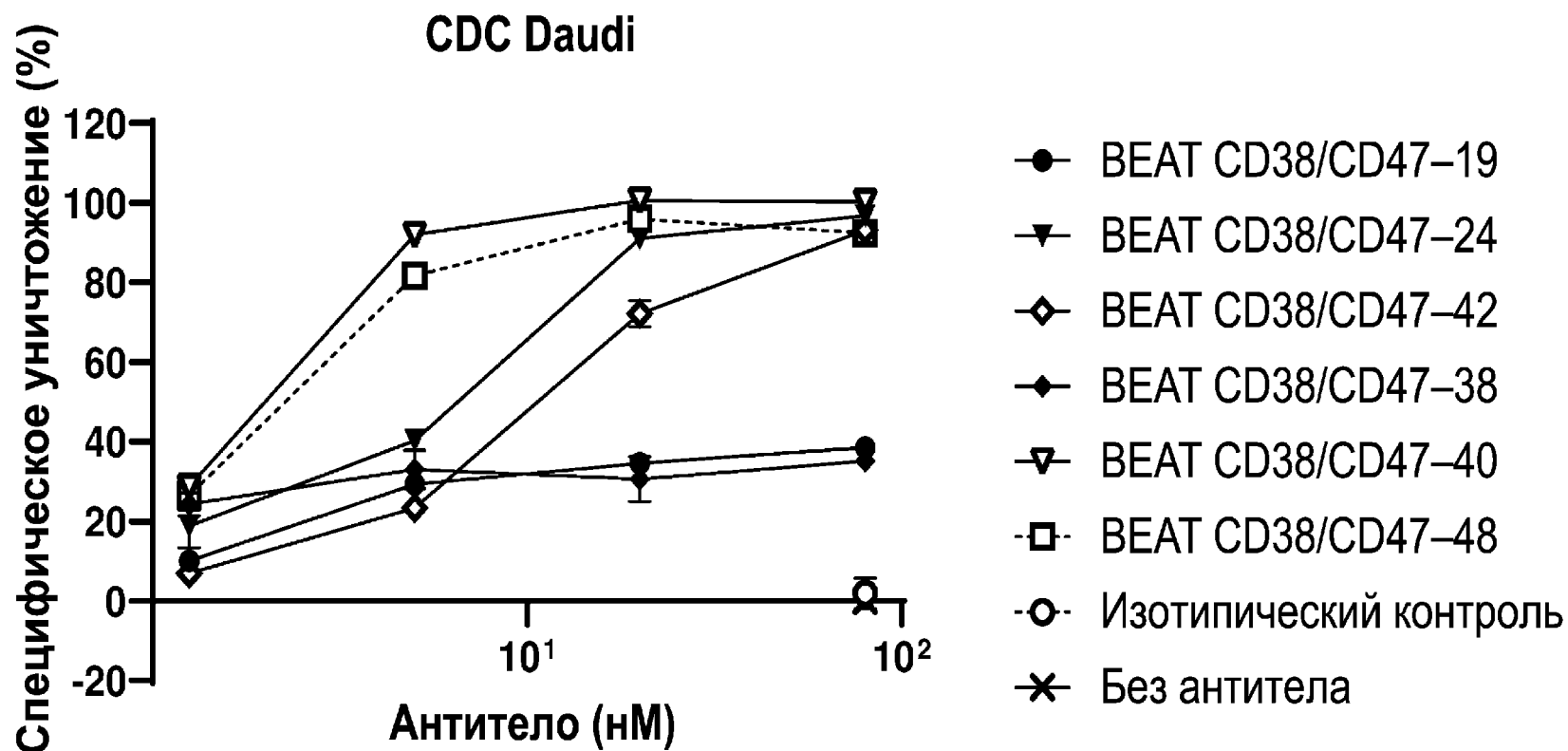


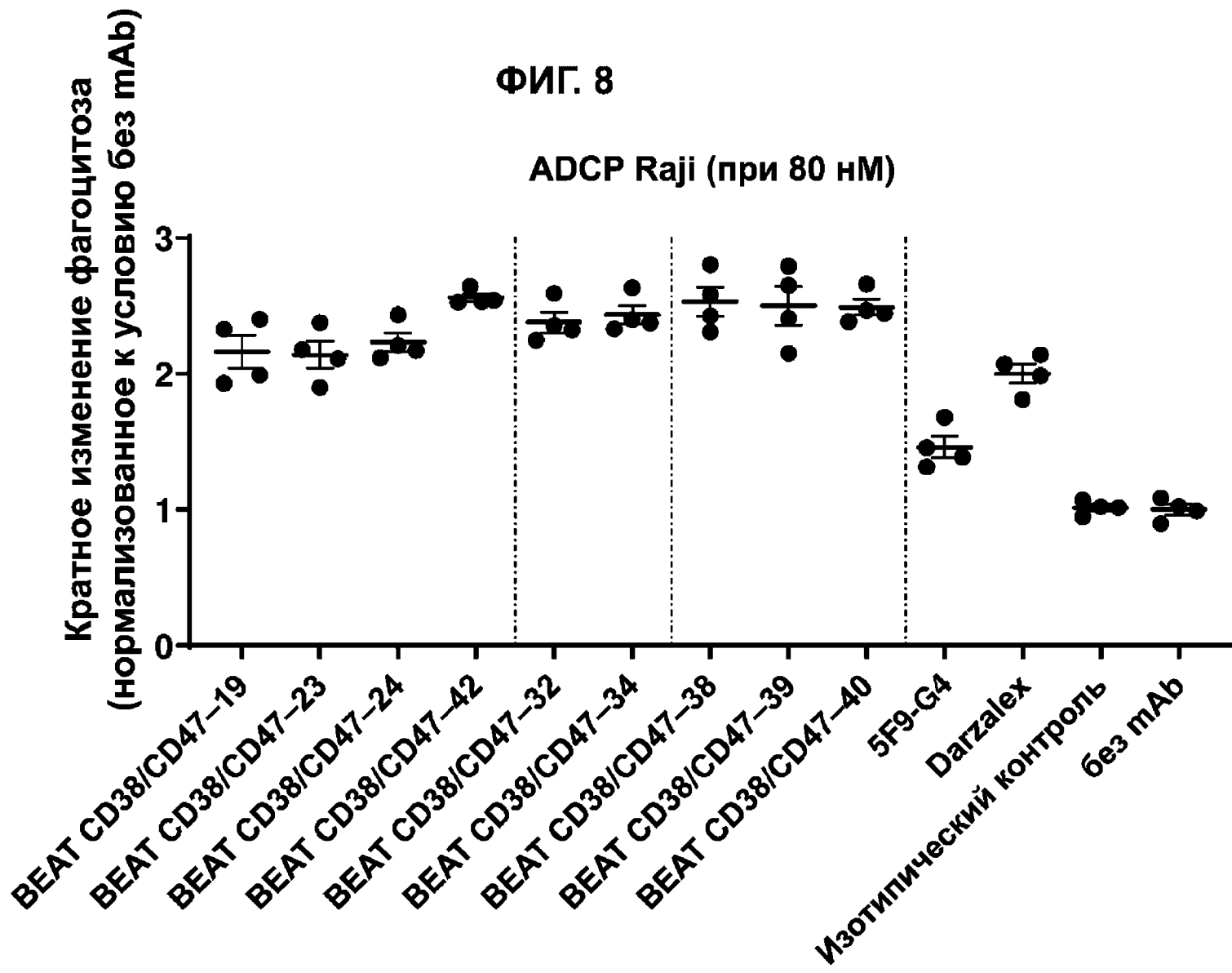
ФИГ. 6



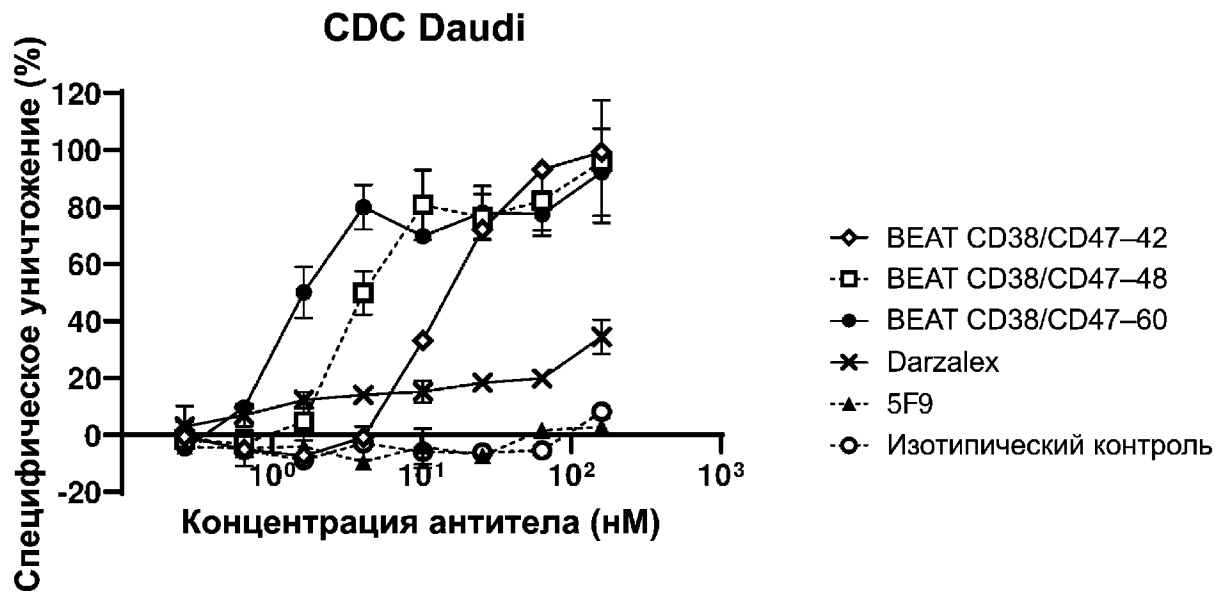
- IgG3 BEAT(A) CH3 [A(-)]
- IgG1
- 1gG1 BEAT(B) CH3 [A(+)]
- VL cLc

ФИГ. 7

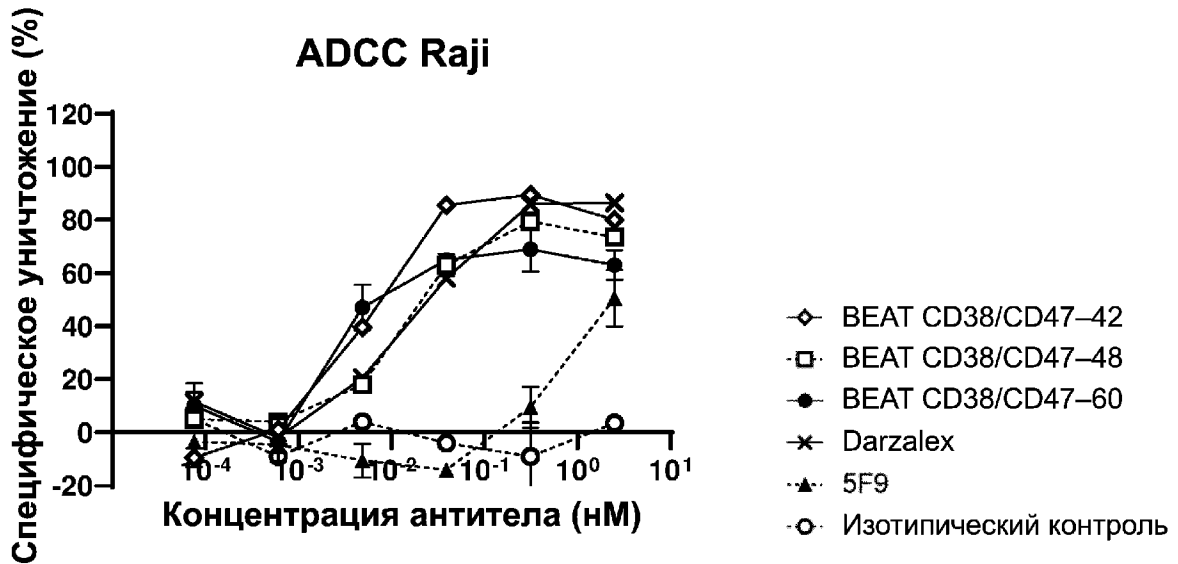




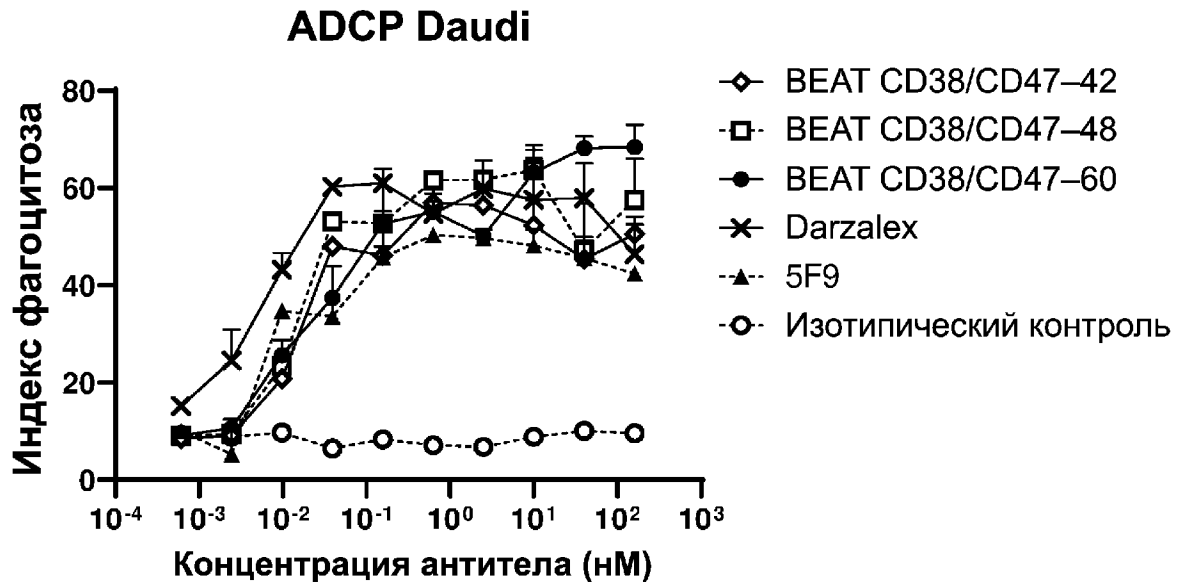
ФИГ. 9А



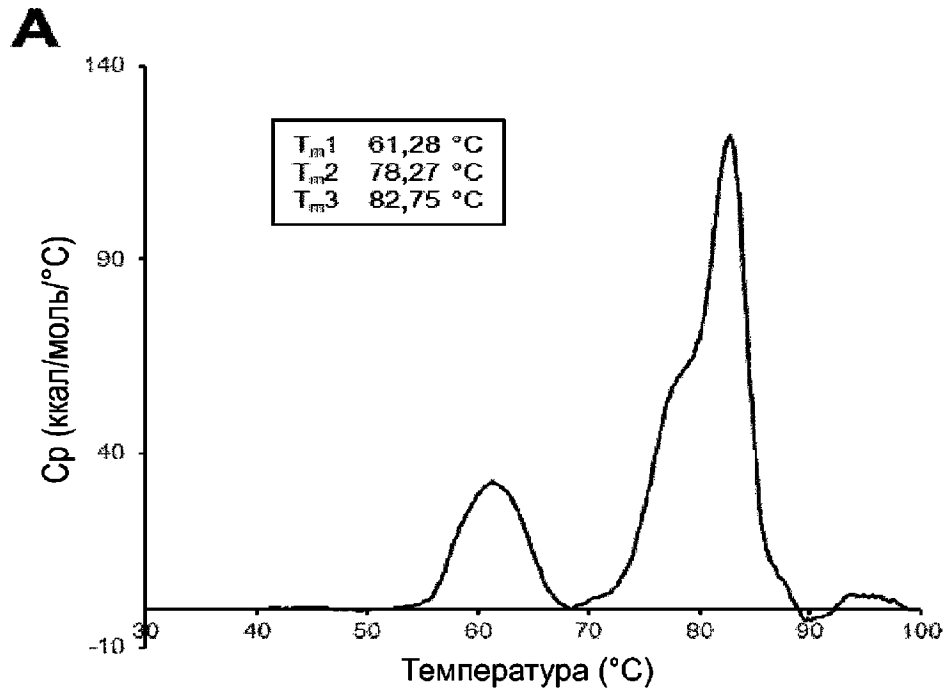
ФИГ. 9В



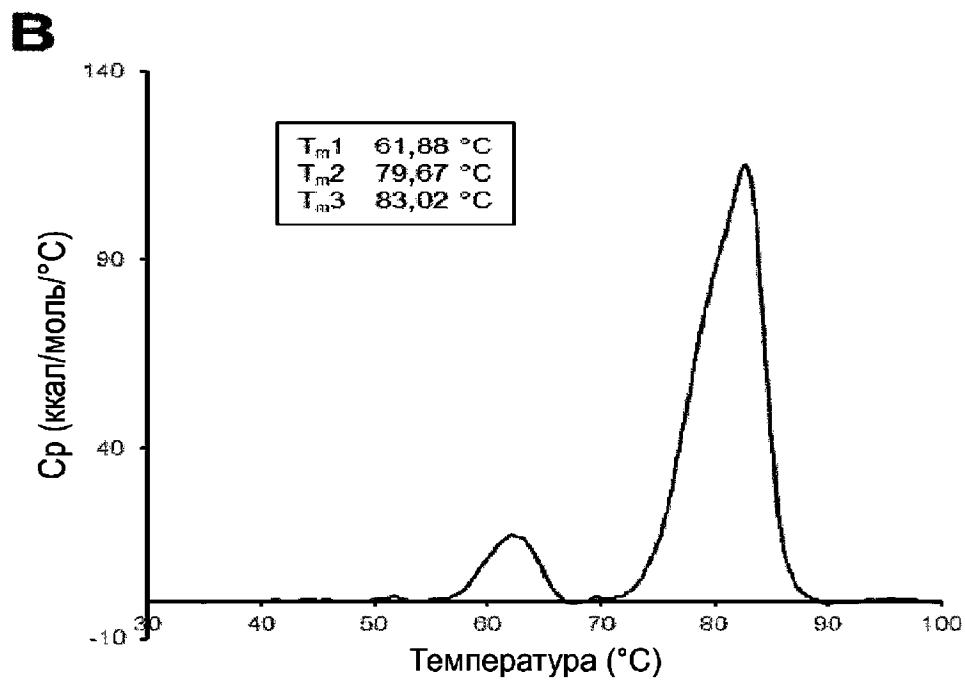
ФИГ. 9С



ФИГ. 10А

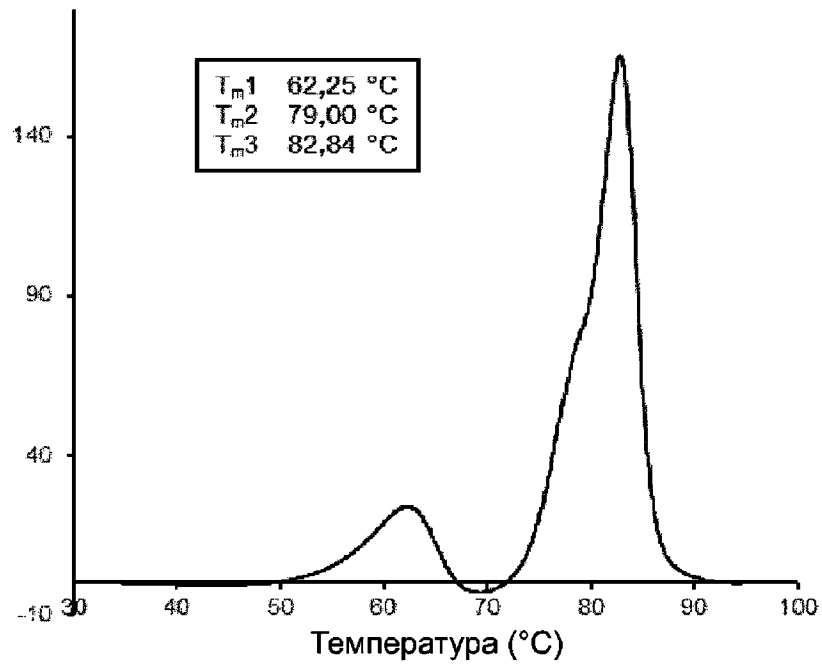


ФИГ. 10В

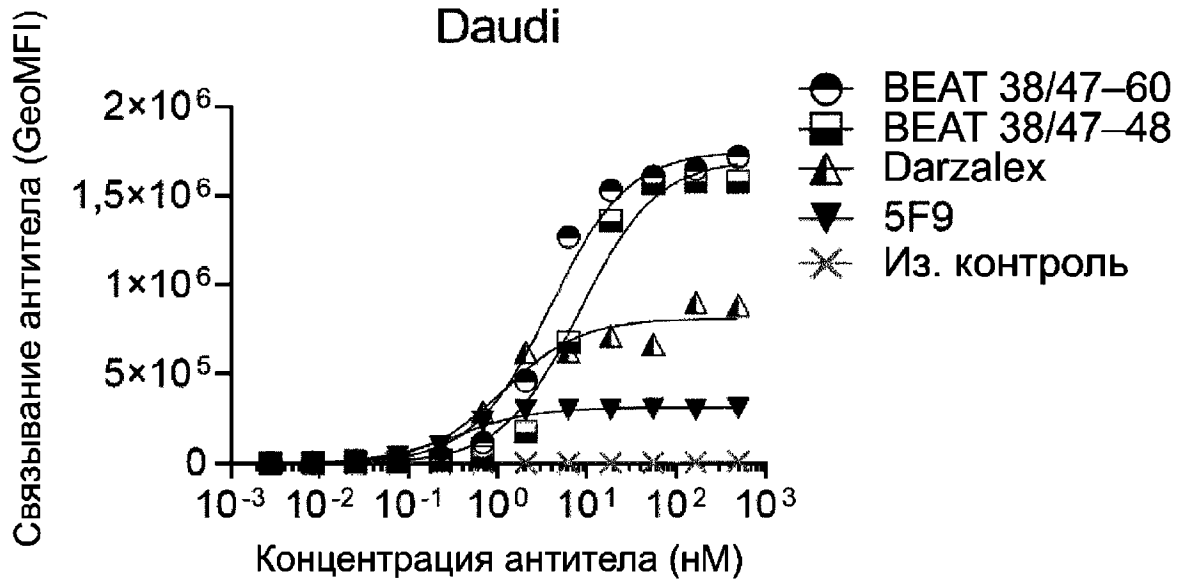


ФИГ. 10С

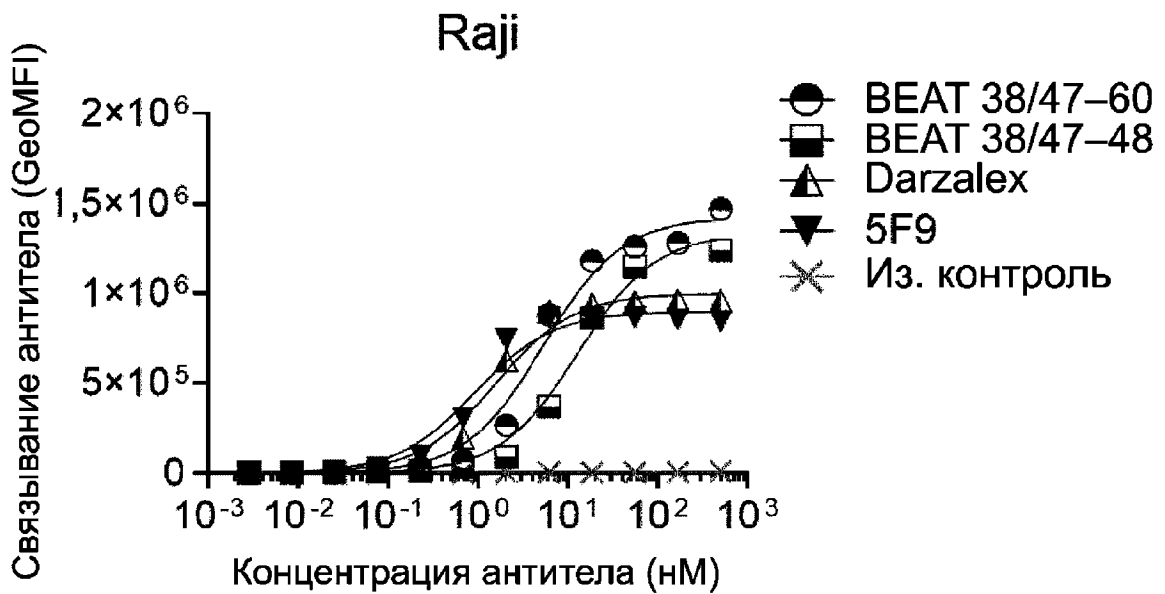
С



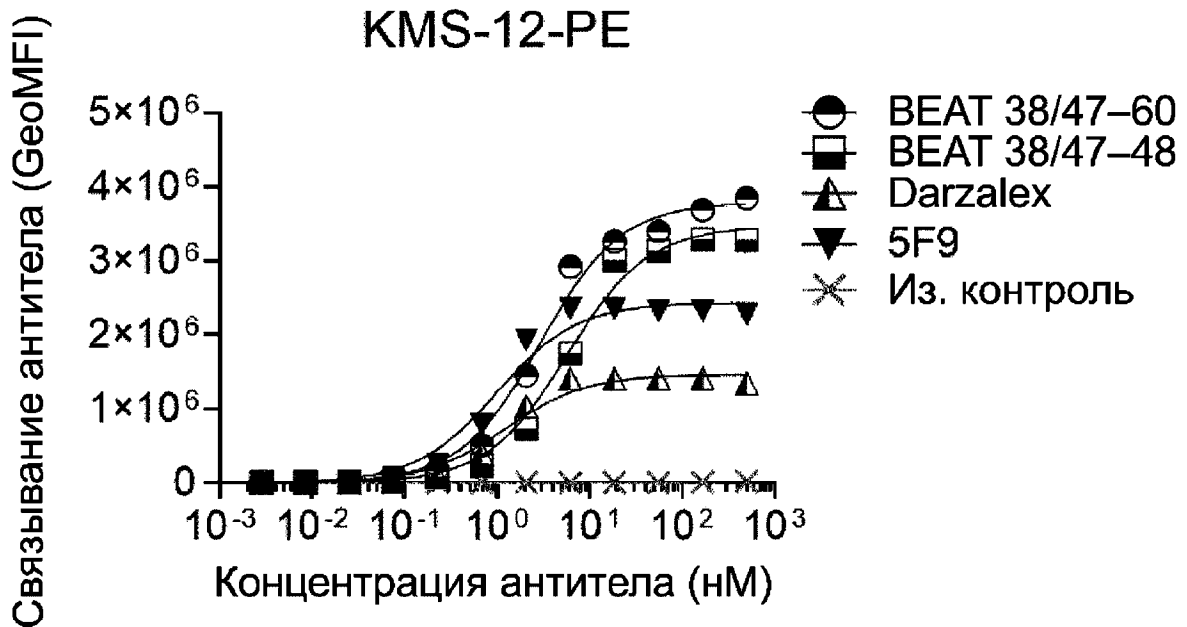
ФИГ. 11А



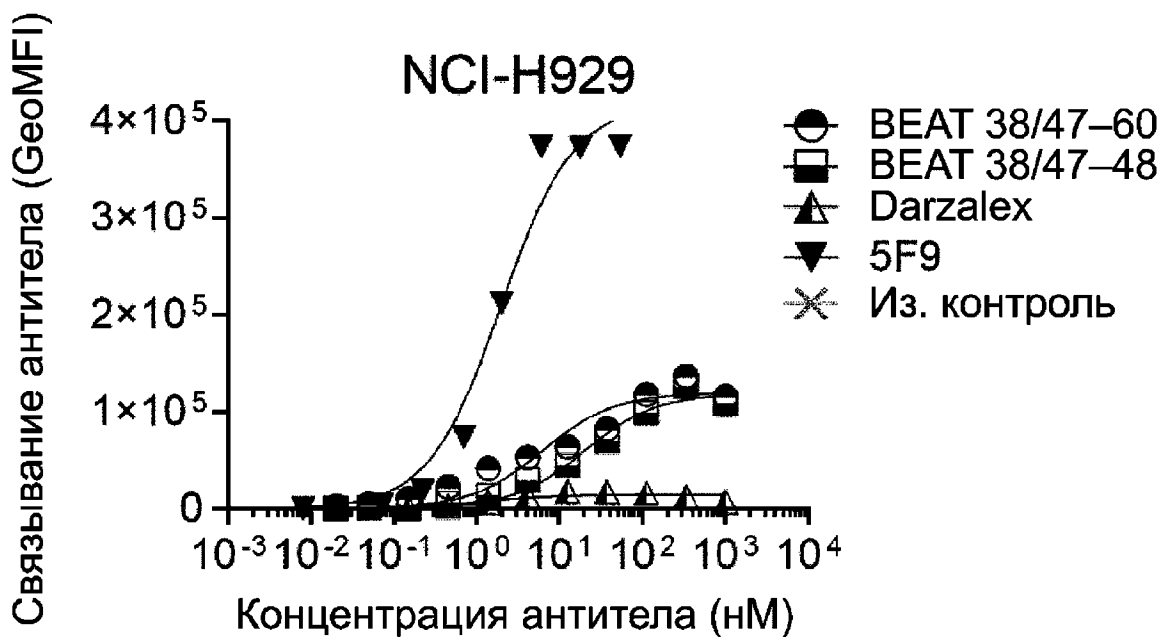
ФИГ. 11В



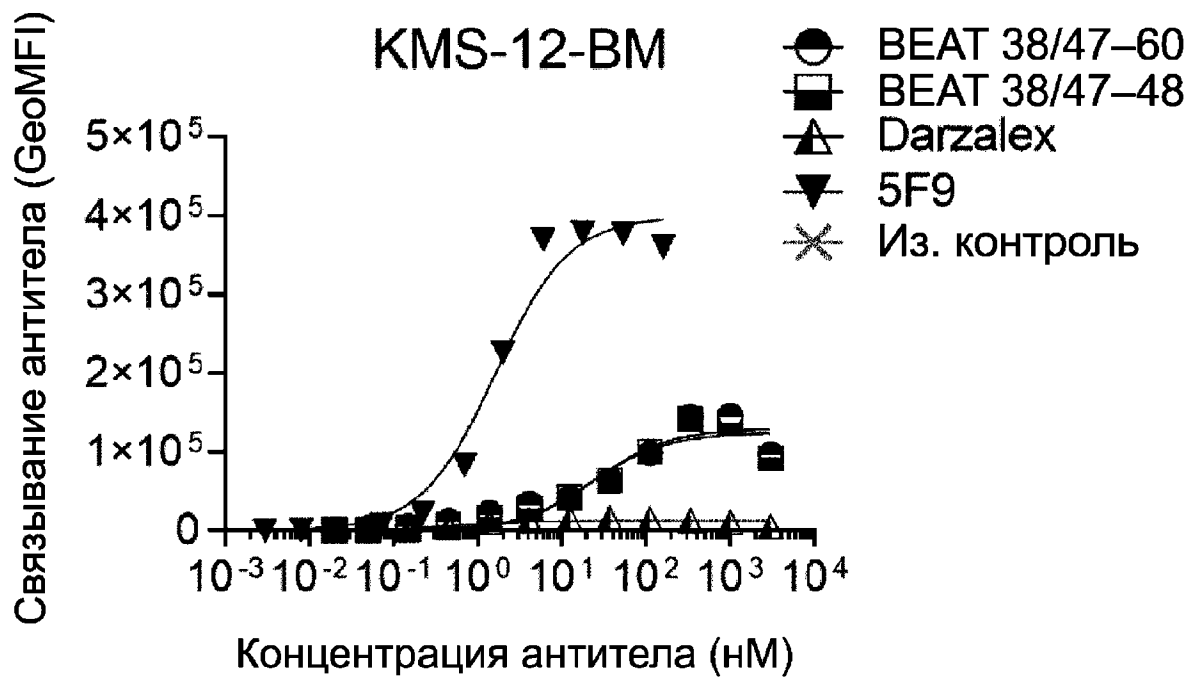
ФИГ. 11С



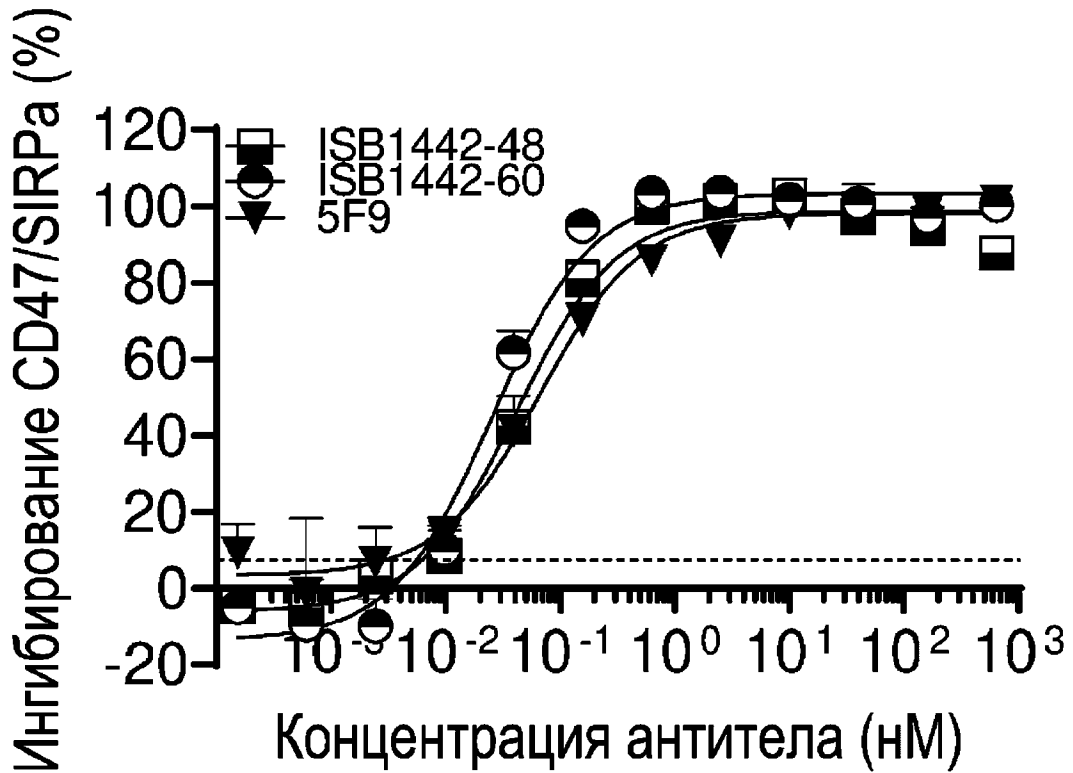
ФИГ. 11D



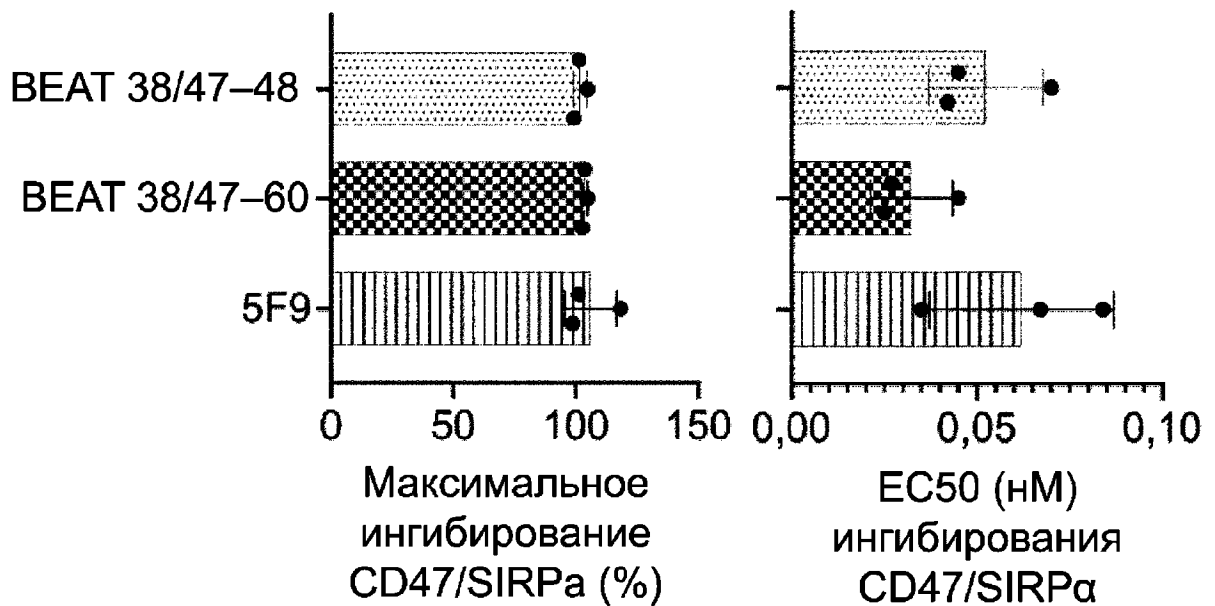
ФИГ. 11Е



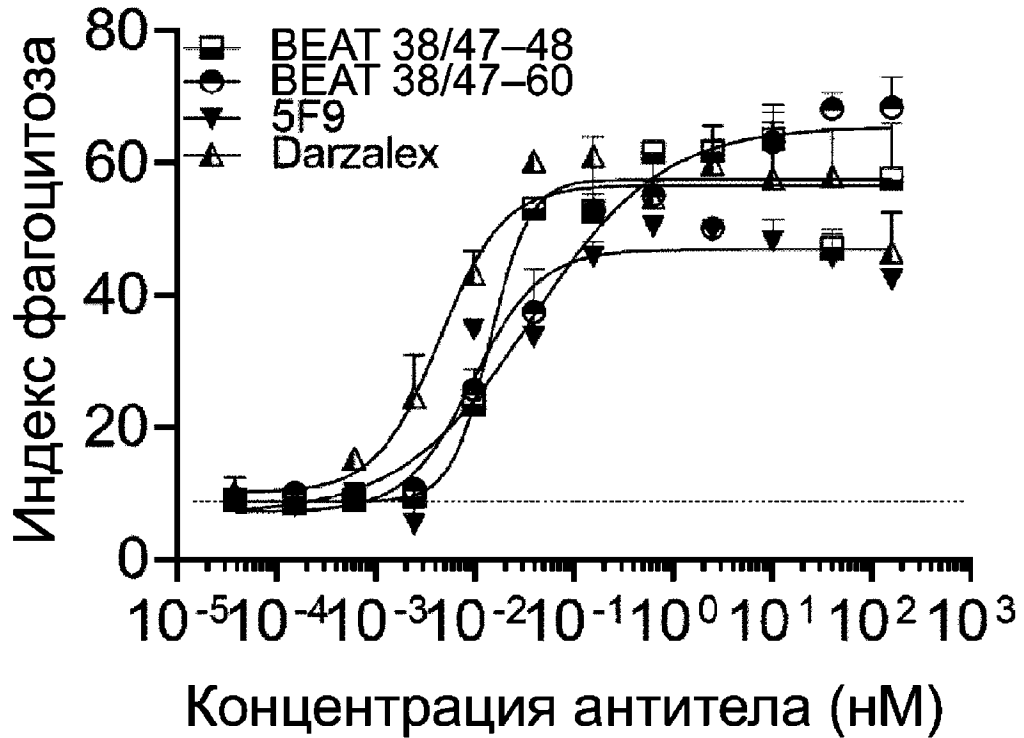
ФИГ. 12А



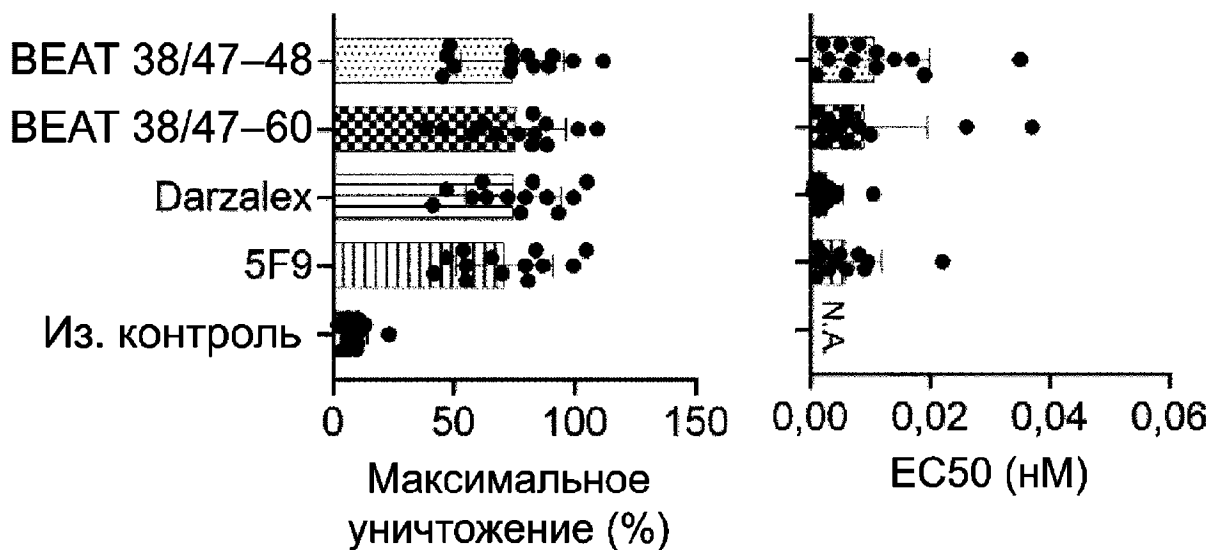
ФИГ. 12В



ФИГ. 13А



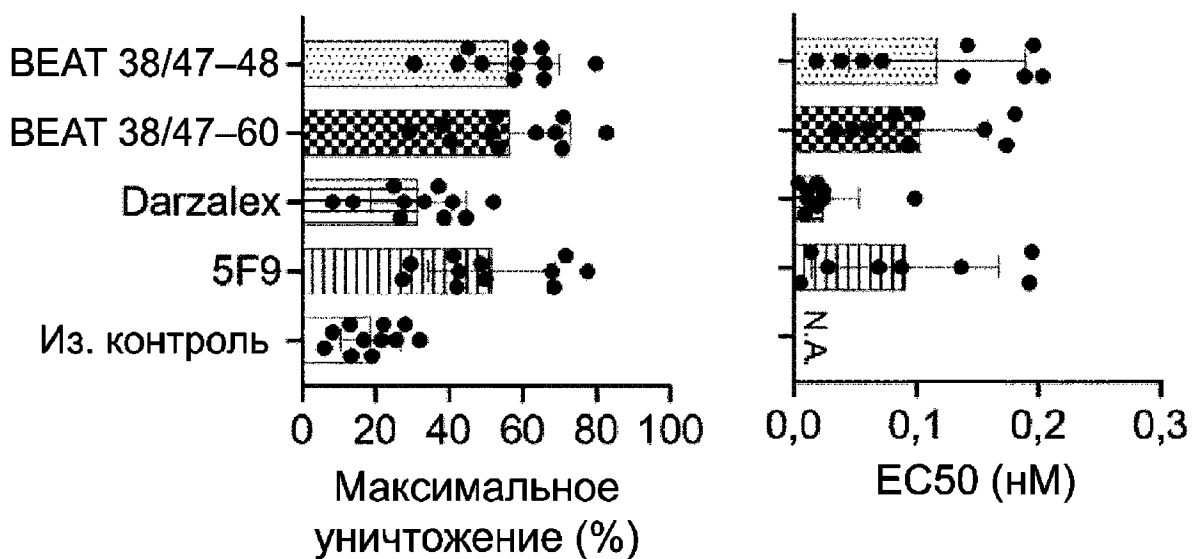
ФИГ. 13В



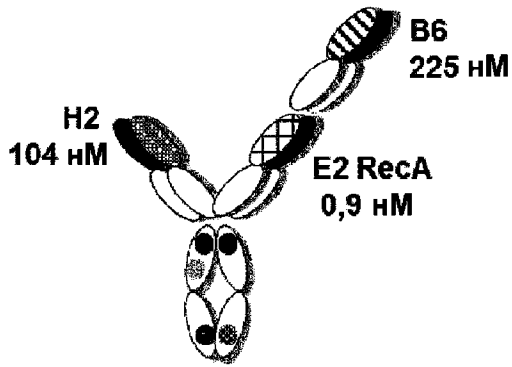
ФИГ. 13С



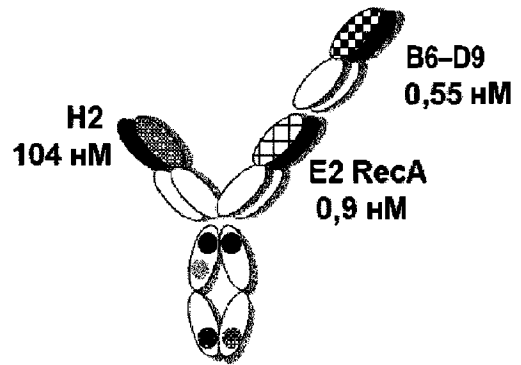
ФИГ. 13D



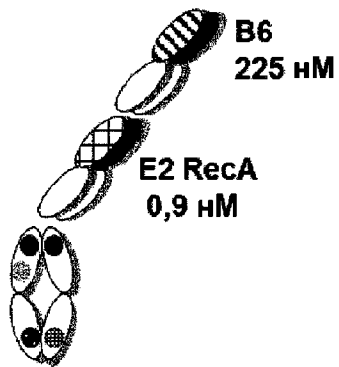
ФИГ. 14А



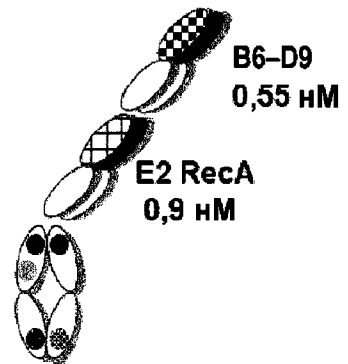
BEAT 38/47-48



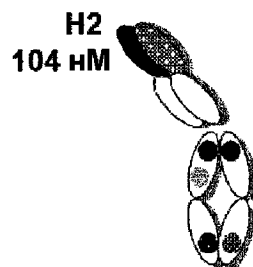
BEAT 38/47-60



Моноплечо 38-59

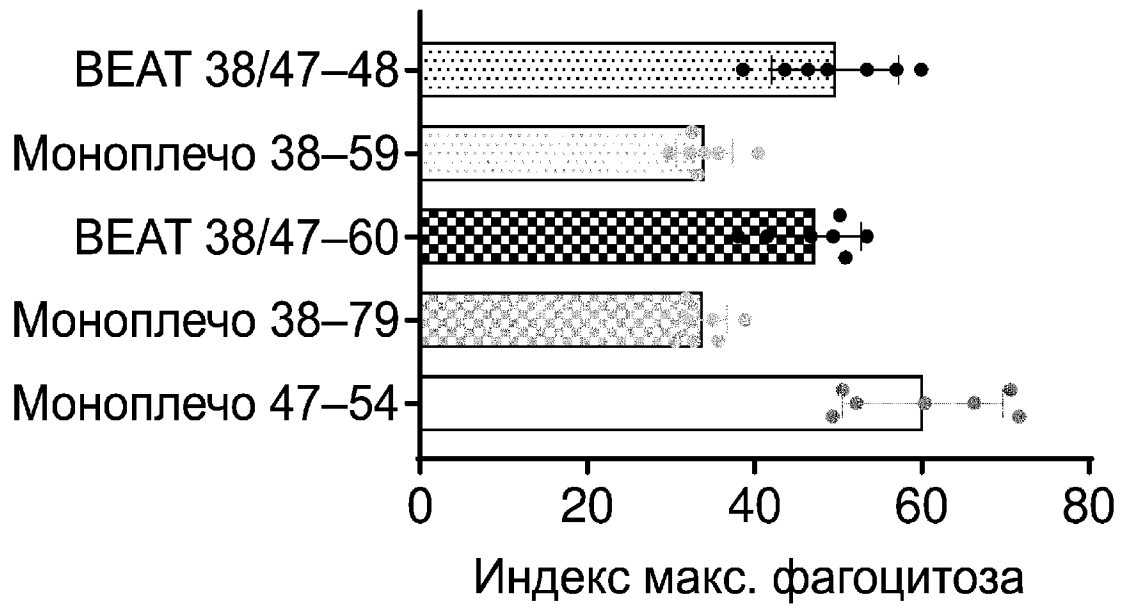


Моноплечо 38-79

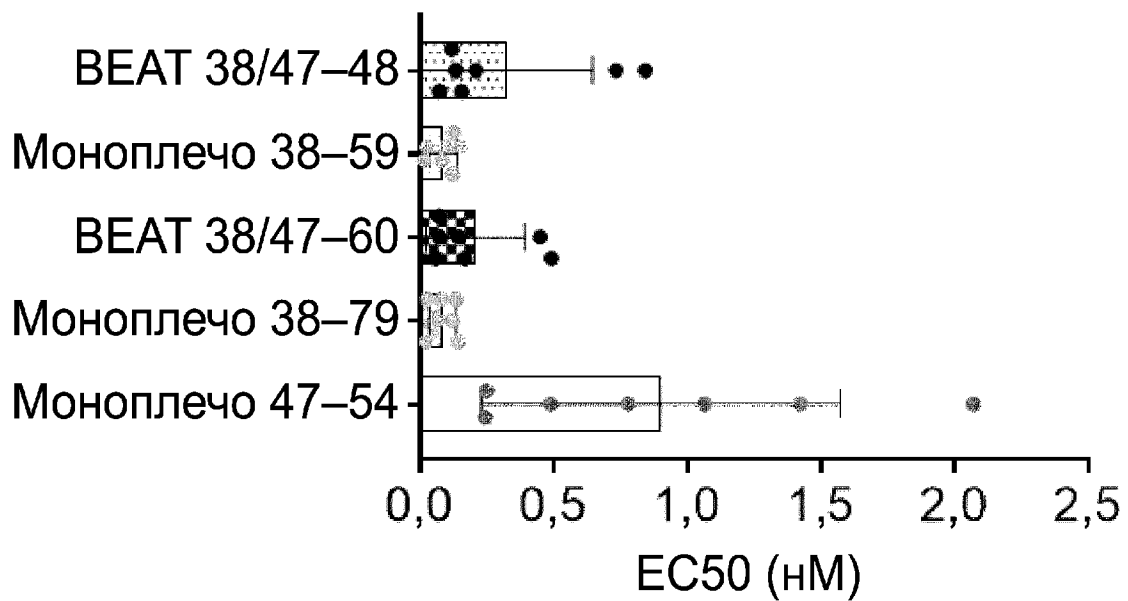


Моноплечо 47-54

ФИГ. 14В



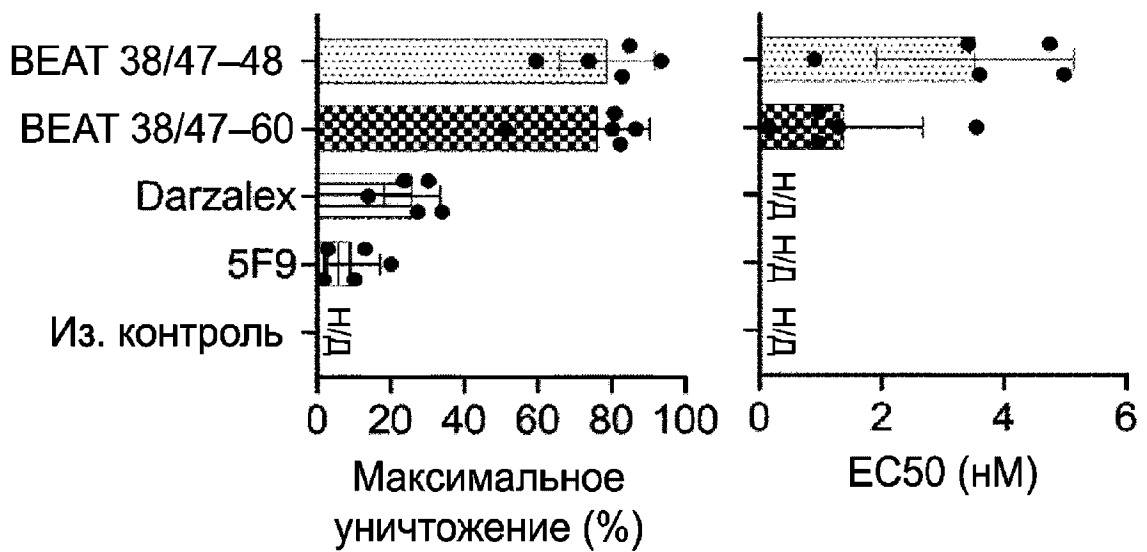
ФИГ. 14С



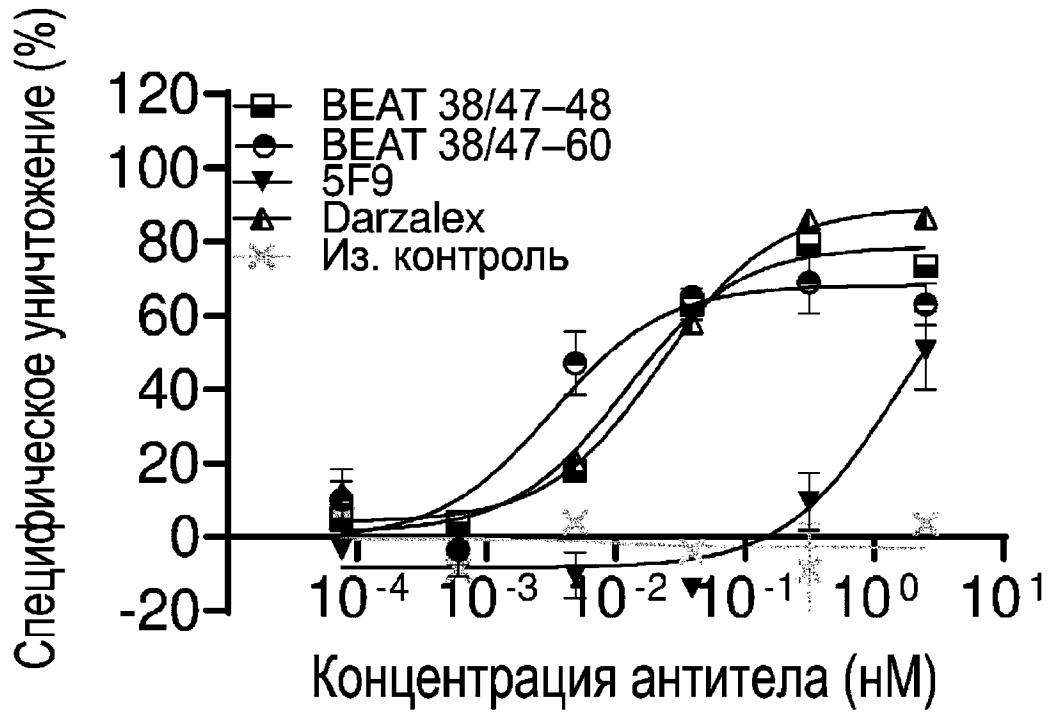
ФИГ. 15А



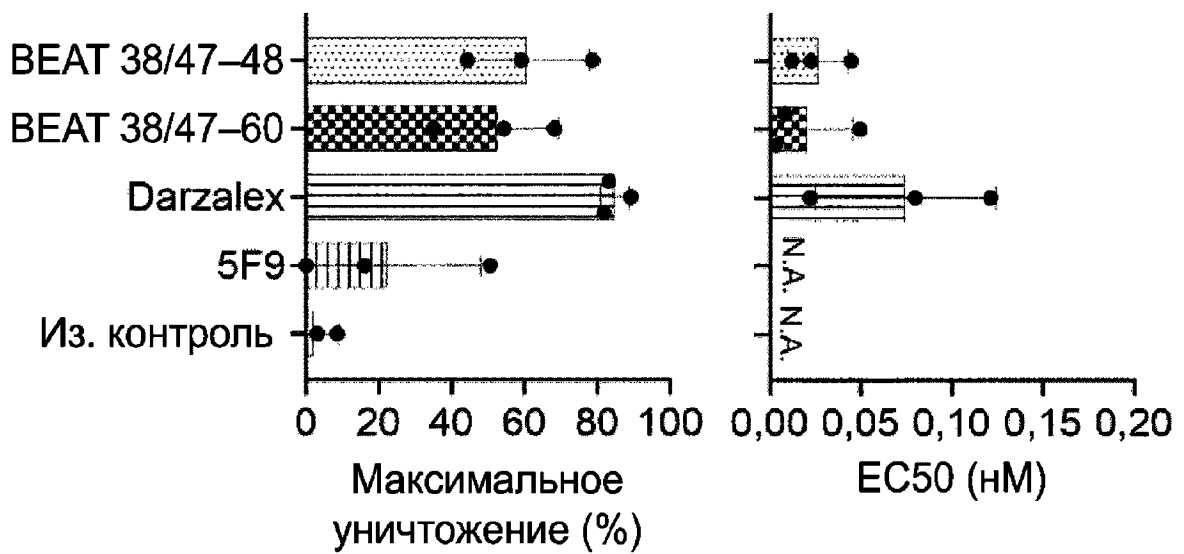
ФИГ. 15В



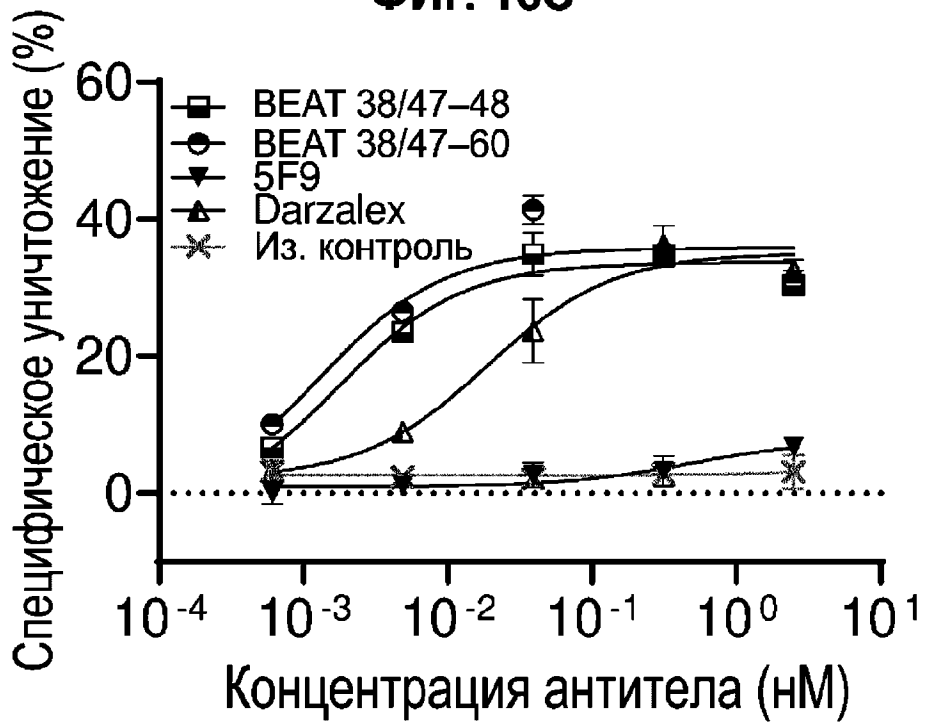
ФИГ. 16А



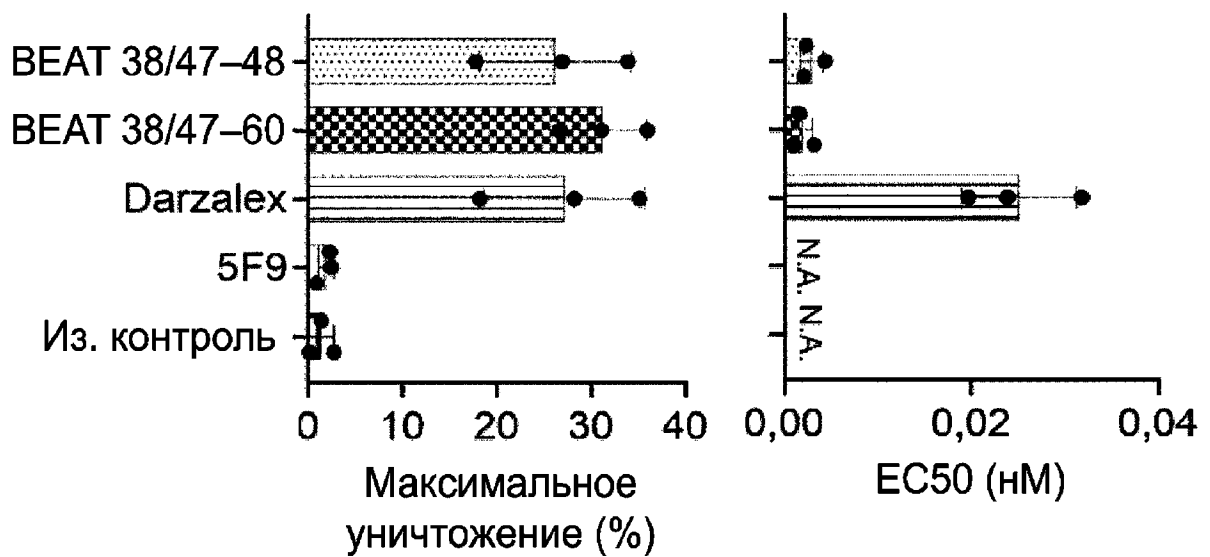
ФИГ. 16В



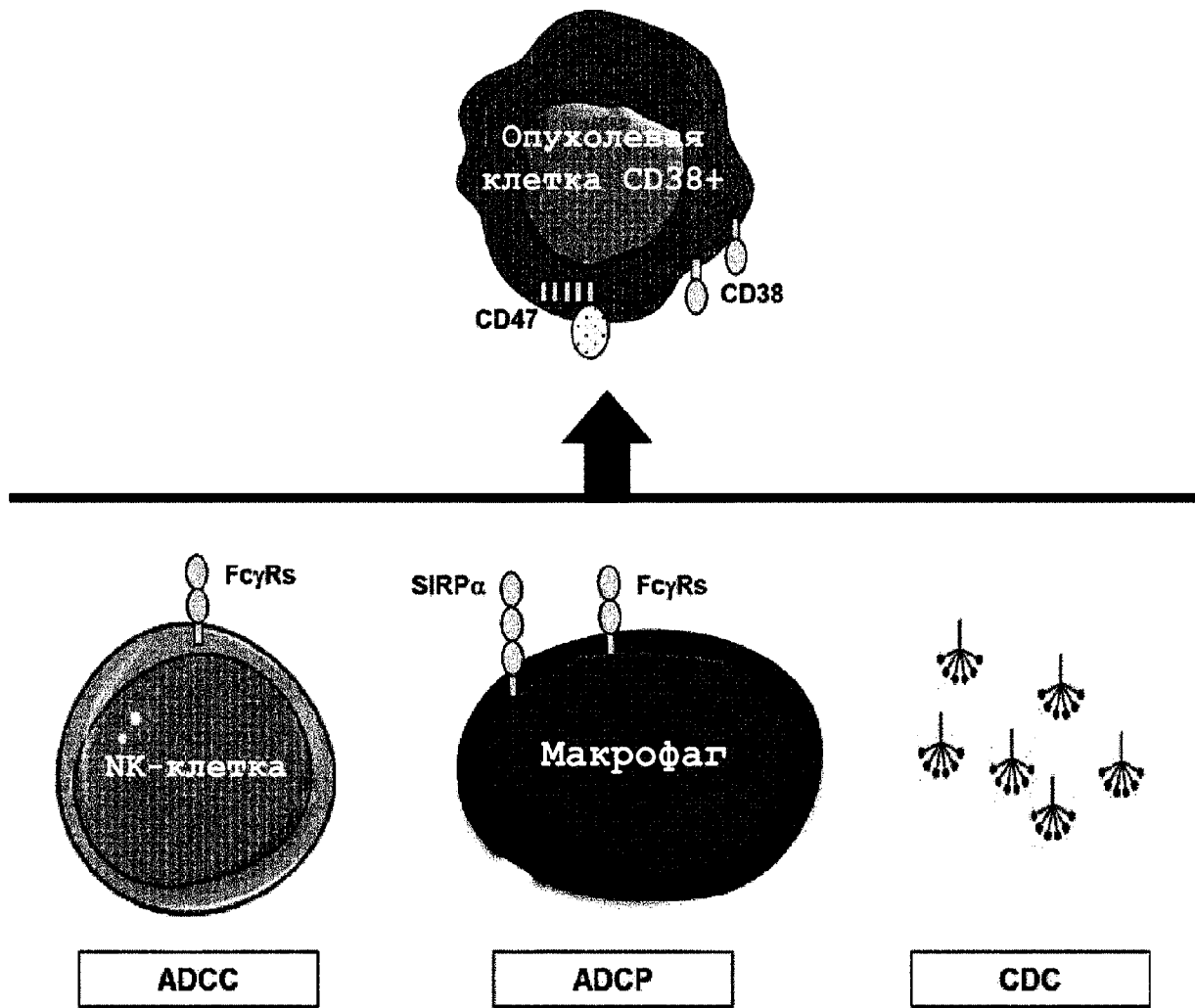
ФИГ. 16С



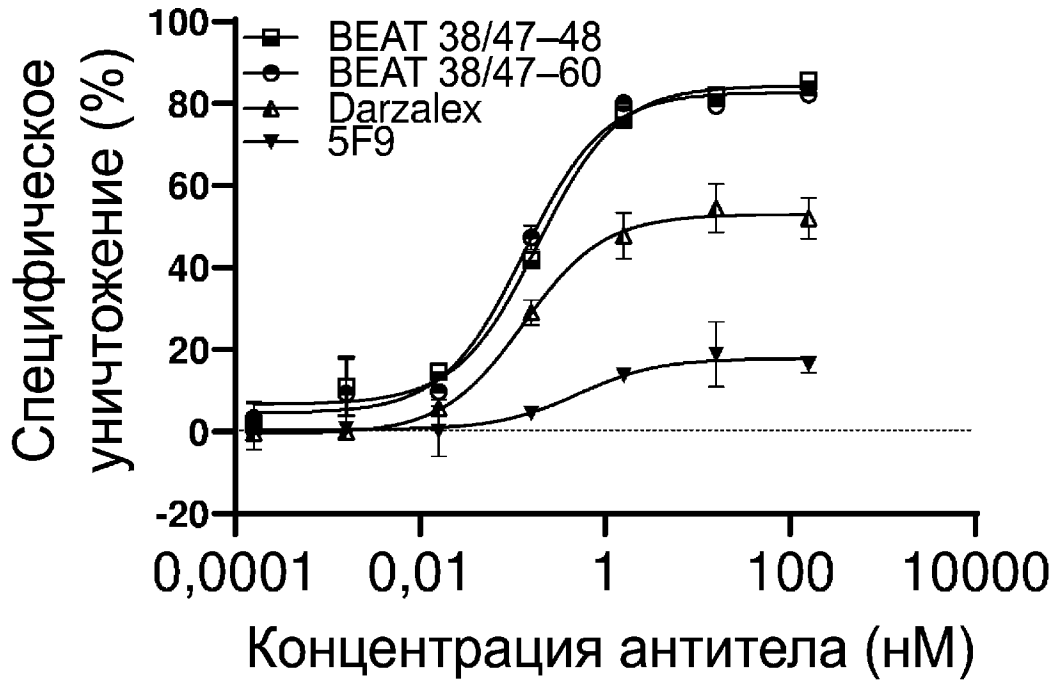
ФИГ. 16D



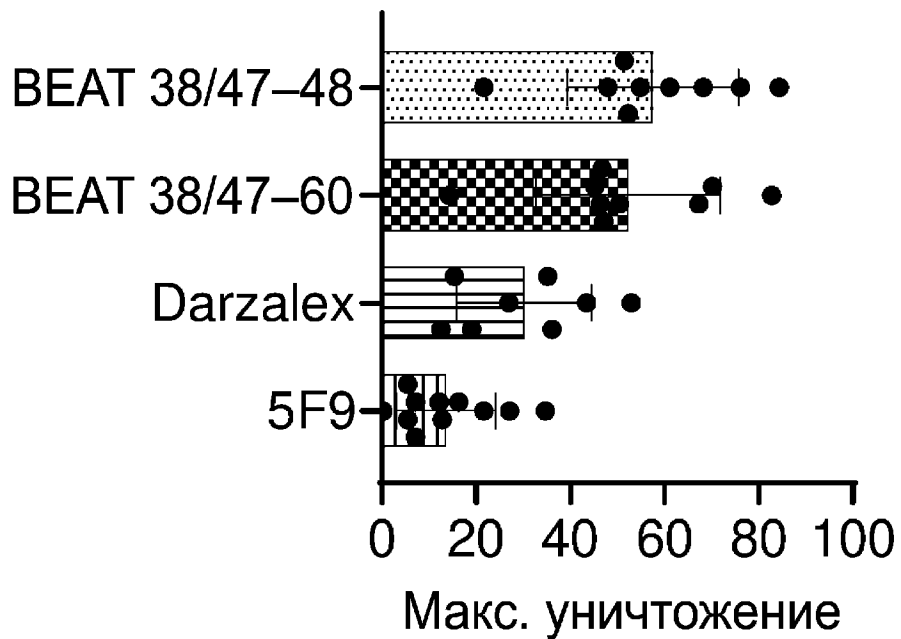
ФИГ. 17А



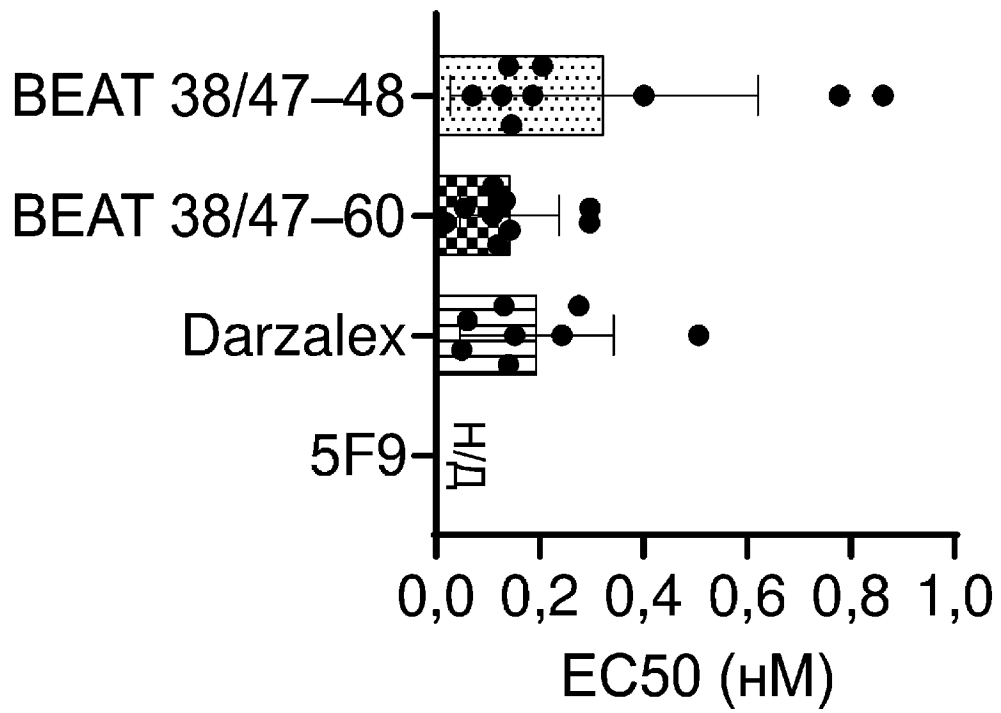
ФИГ. 17В



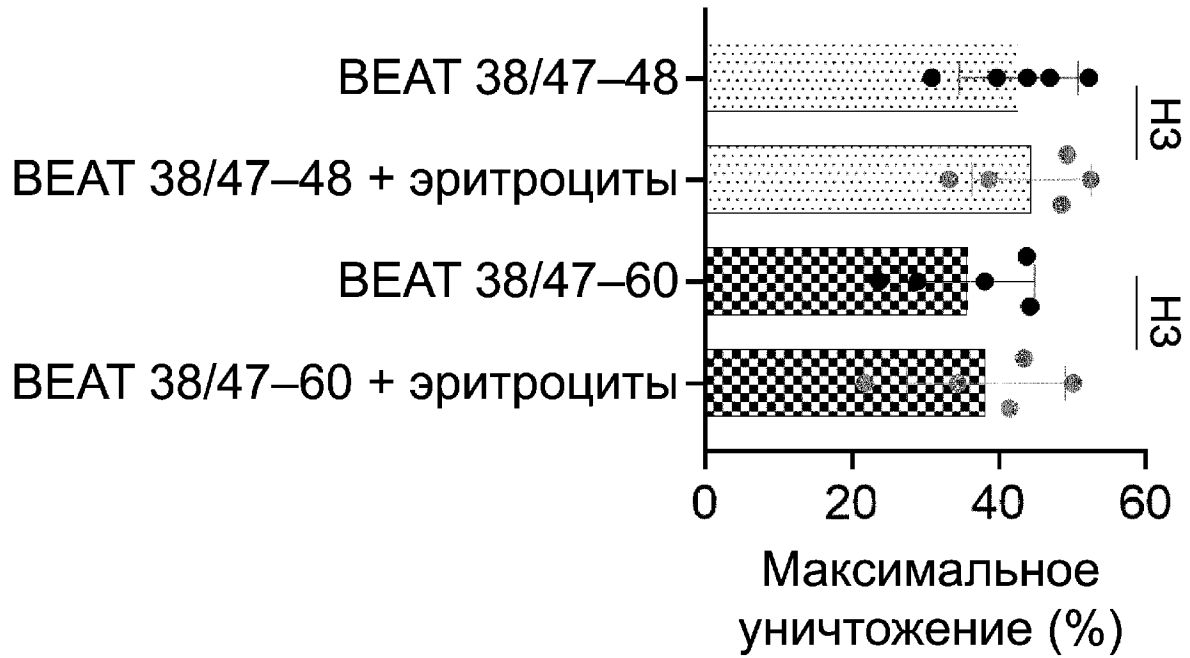
ФИГ. 17С



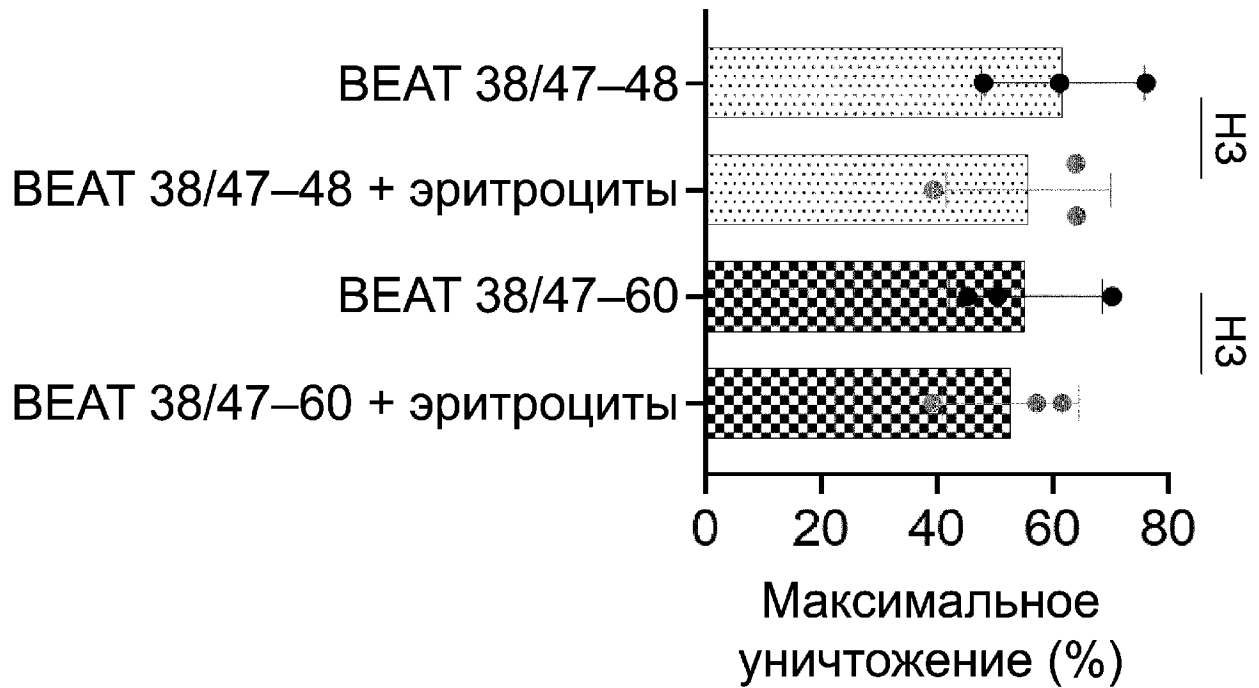
ФИГ. 17D



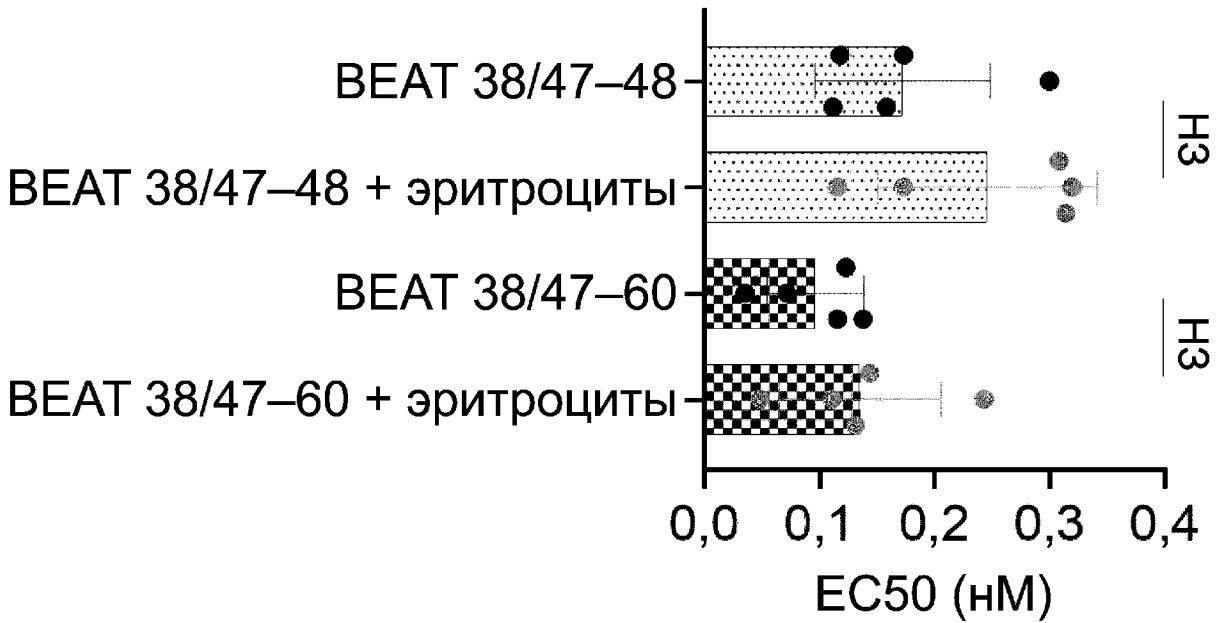
ФИГ. 18А



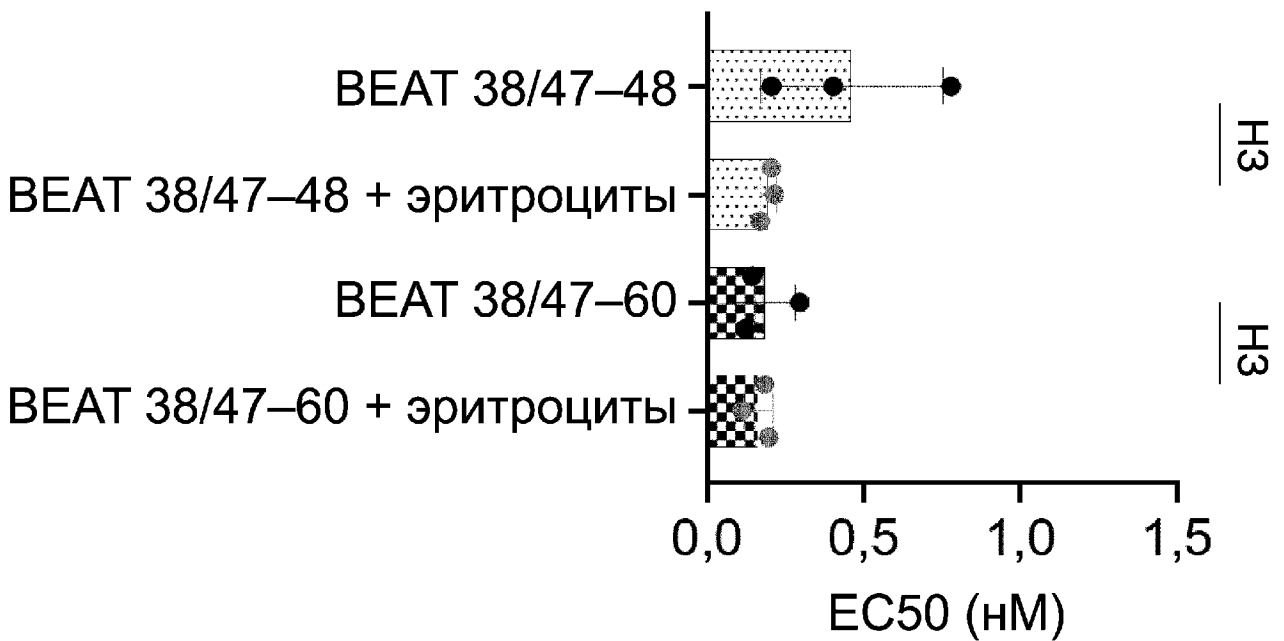
ФИГ. 18В



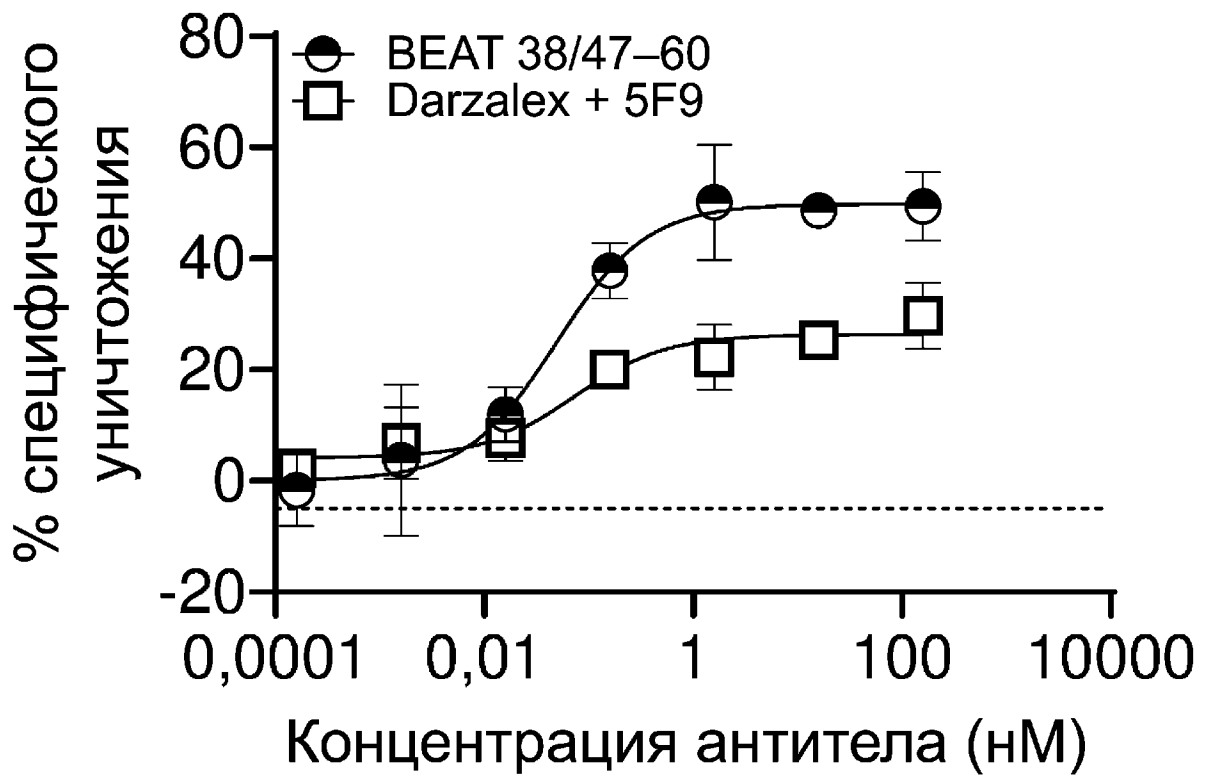
ФИГ. 18С



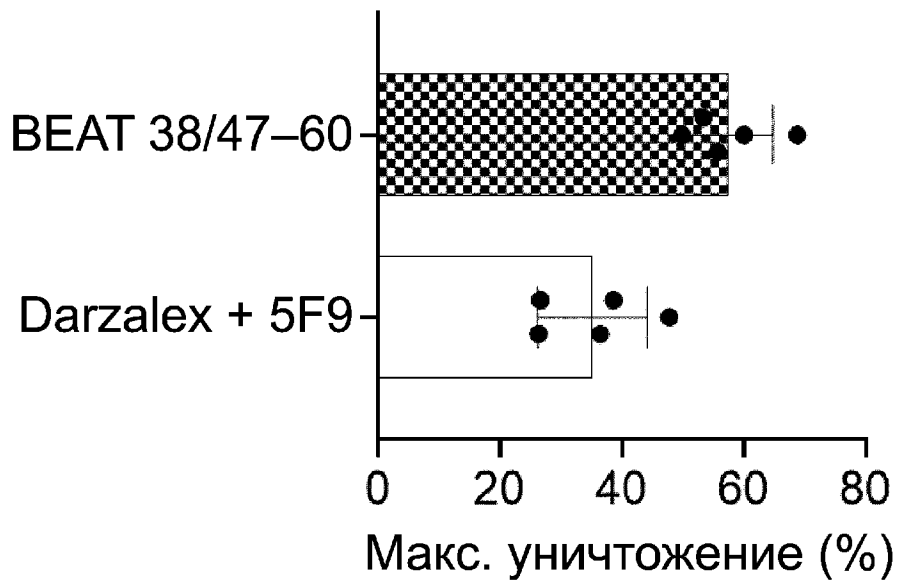
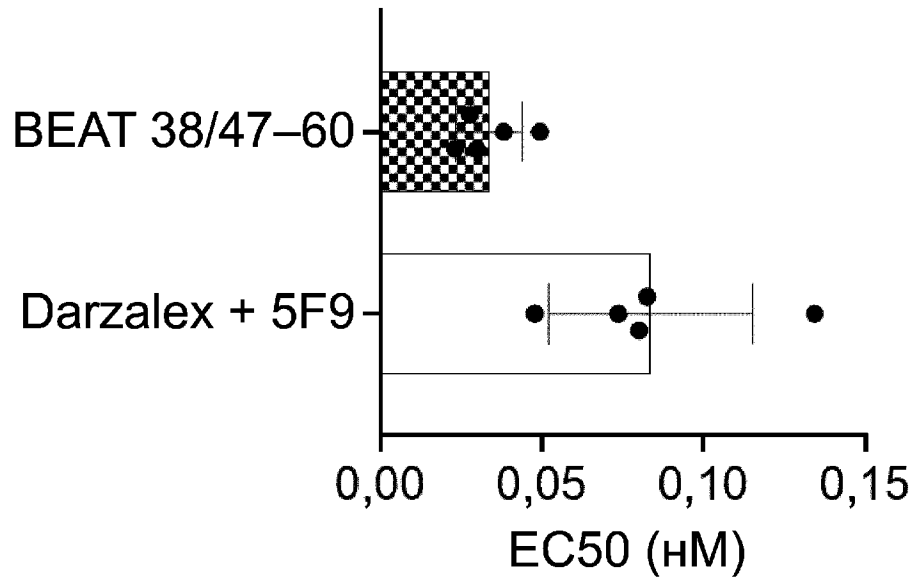
ФИГ. 18D



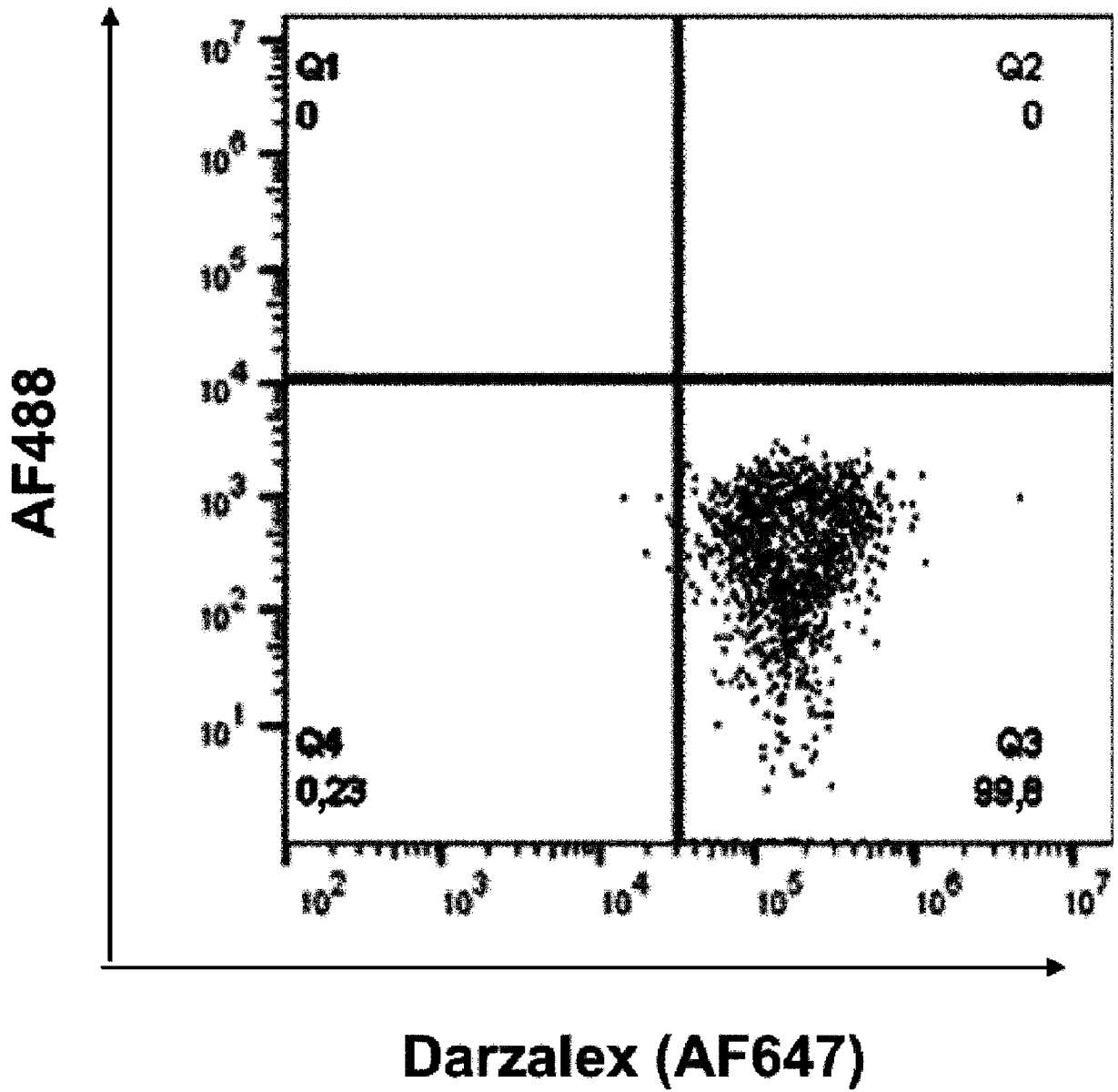
ФИГ. 19А



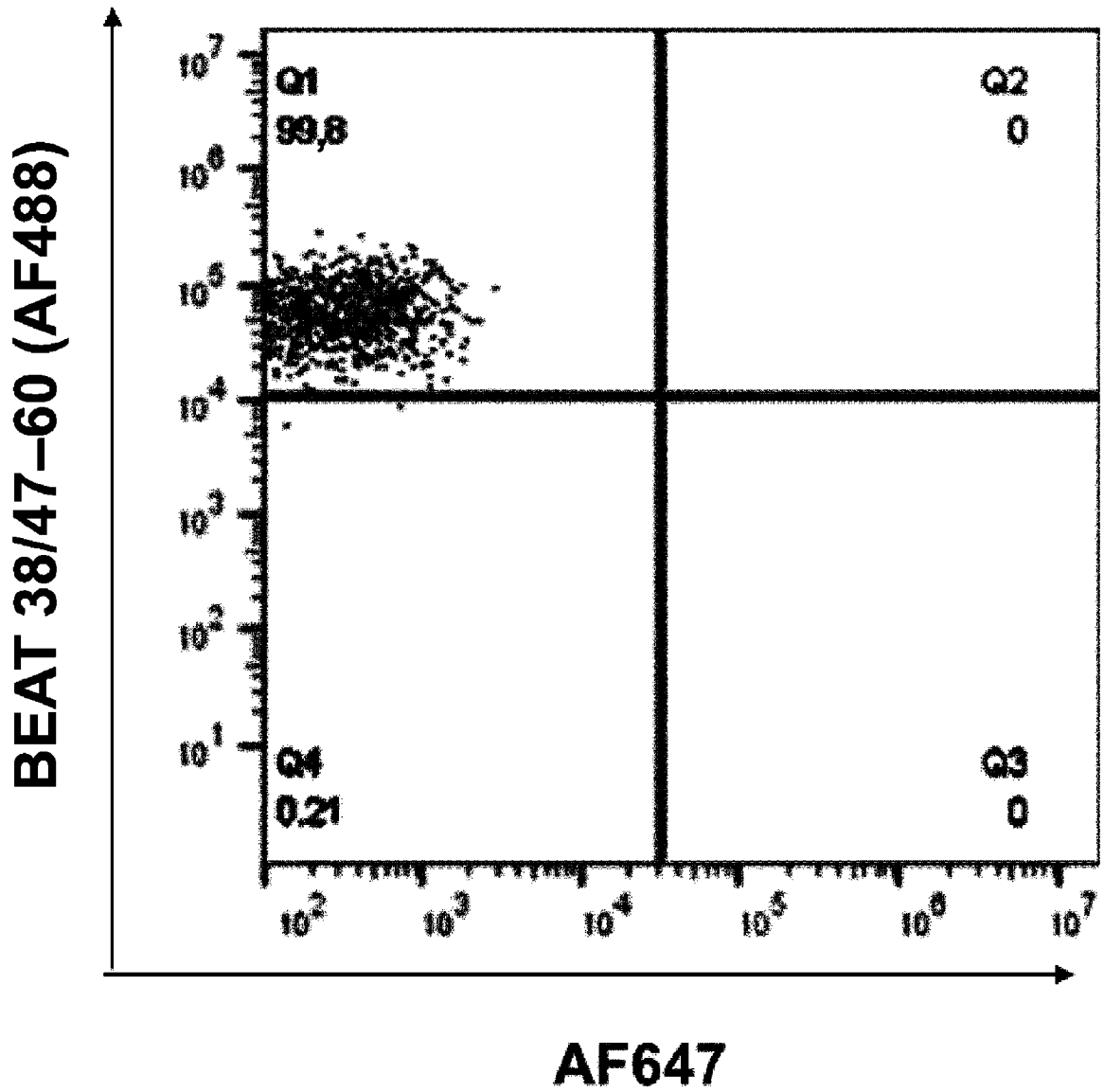
ФИГ. 19В



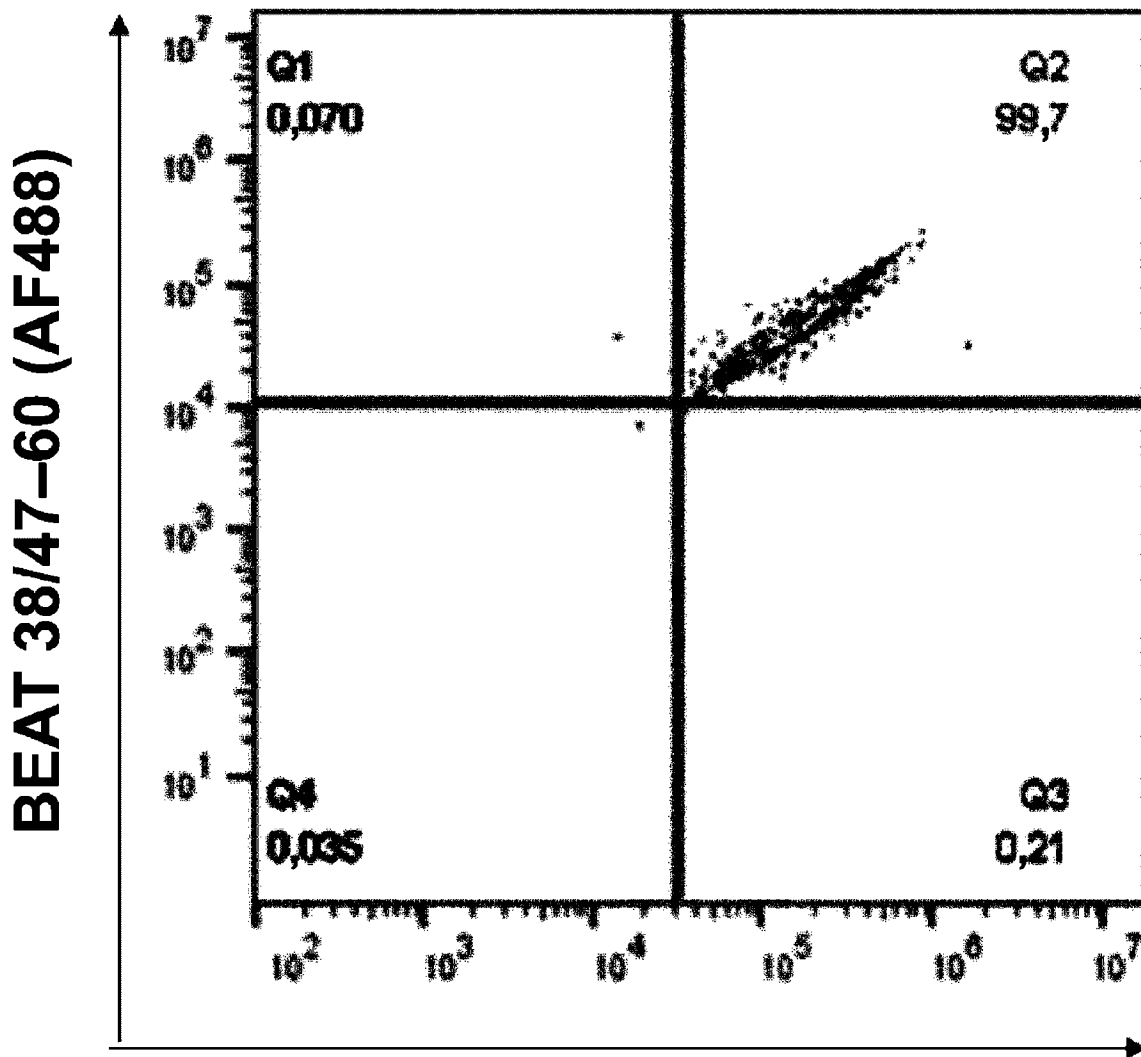
ФИГ. 20А



ФИГ. 20В

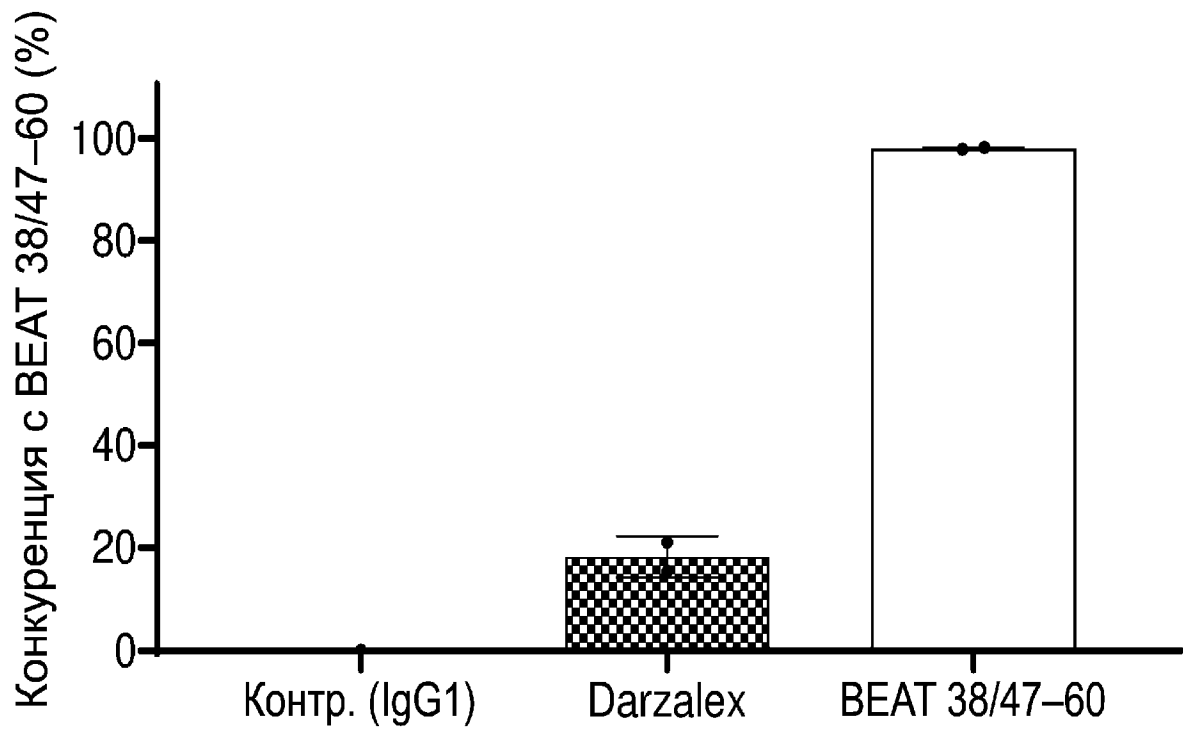


ФИГ. 20С

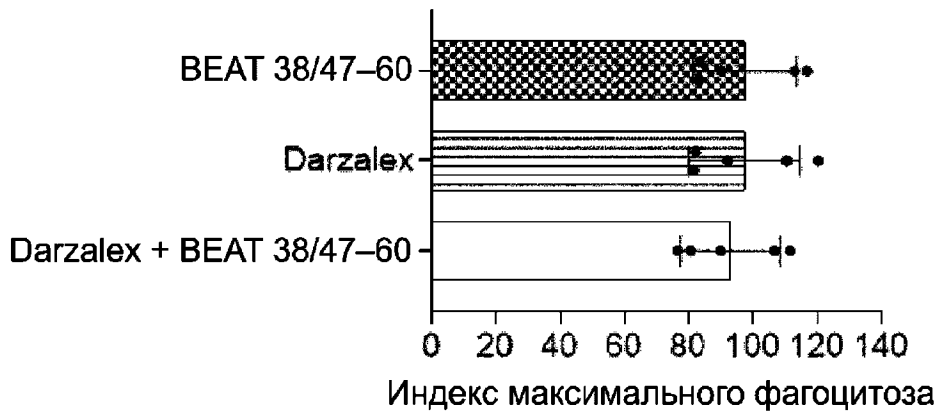
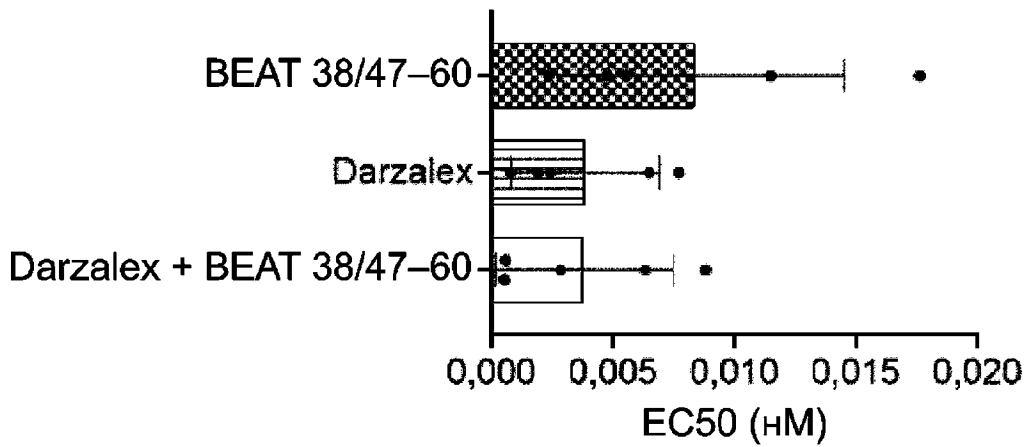
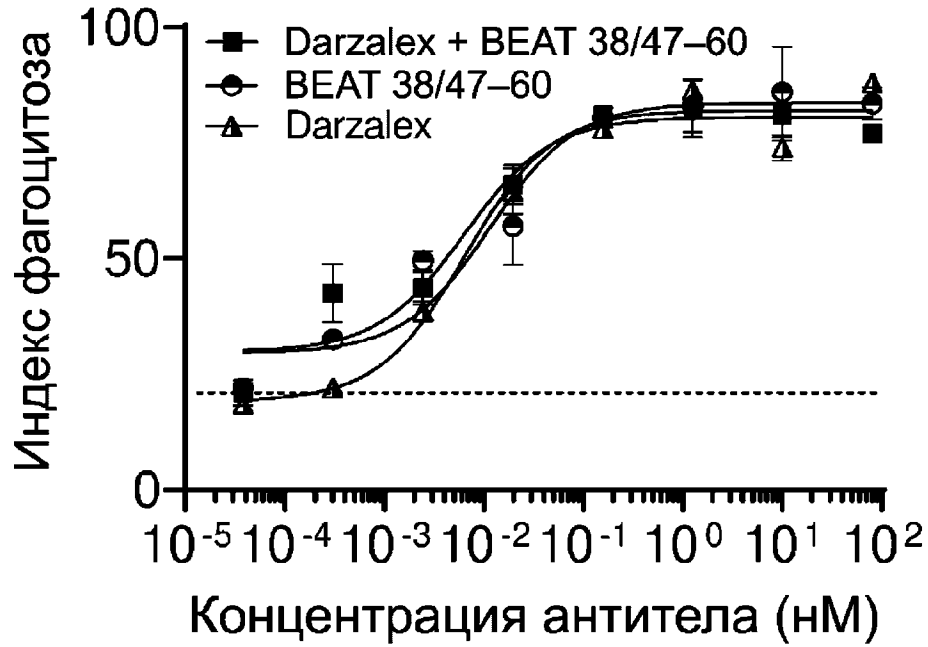


Darzalex AF647

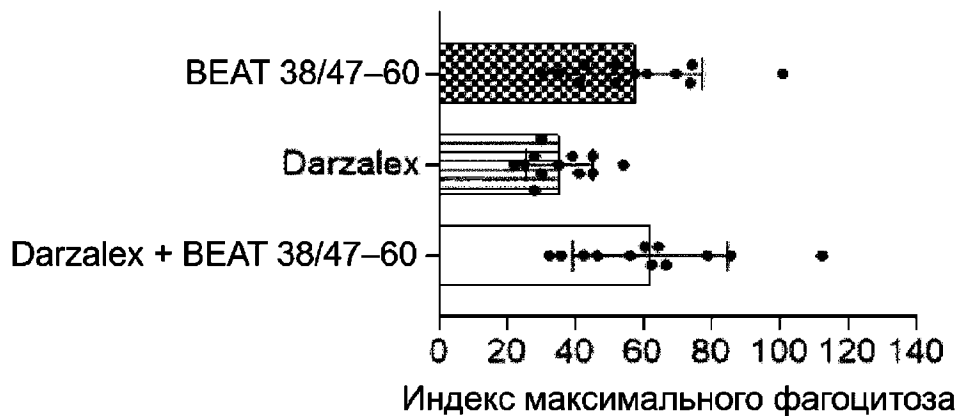
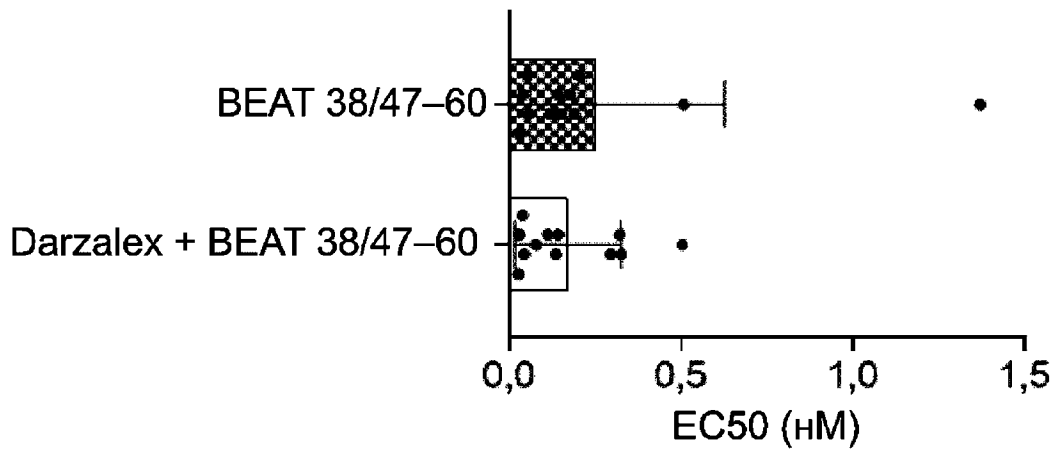
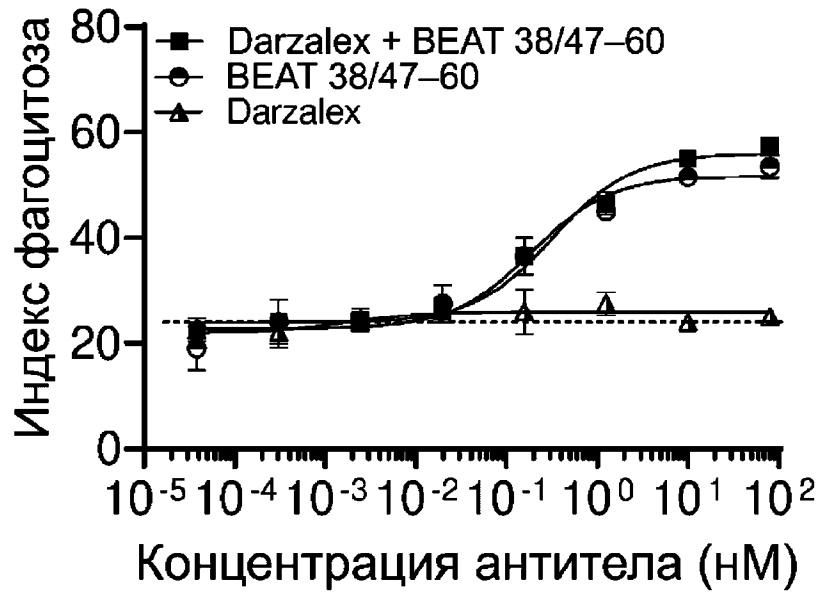
ФИГ. 20D



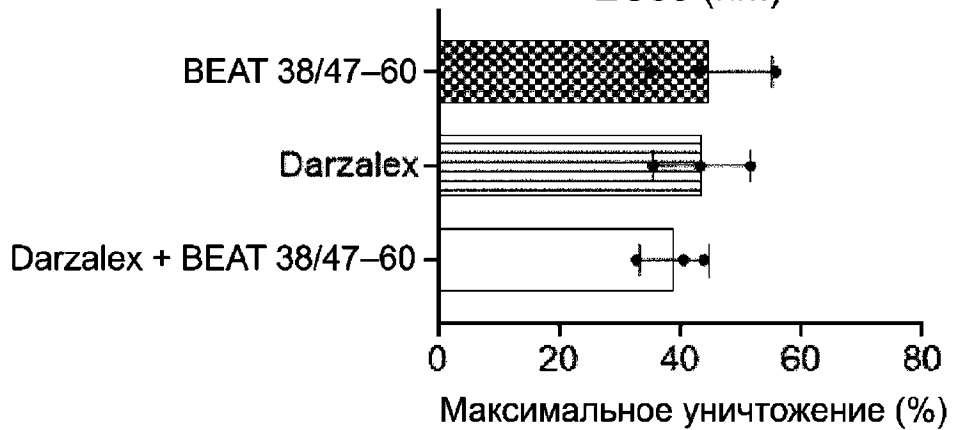
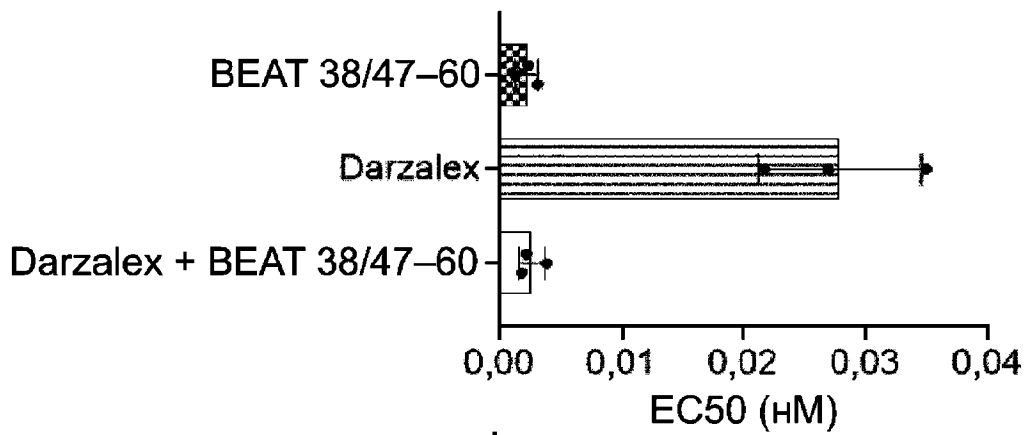
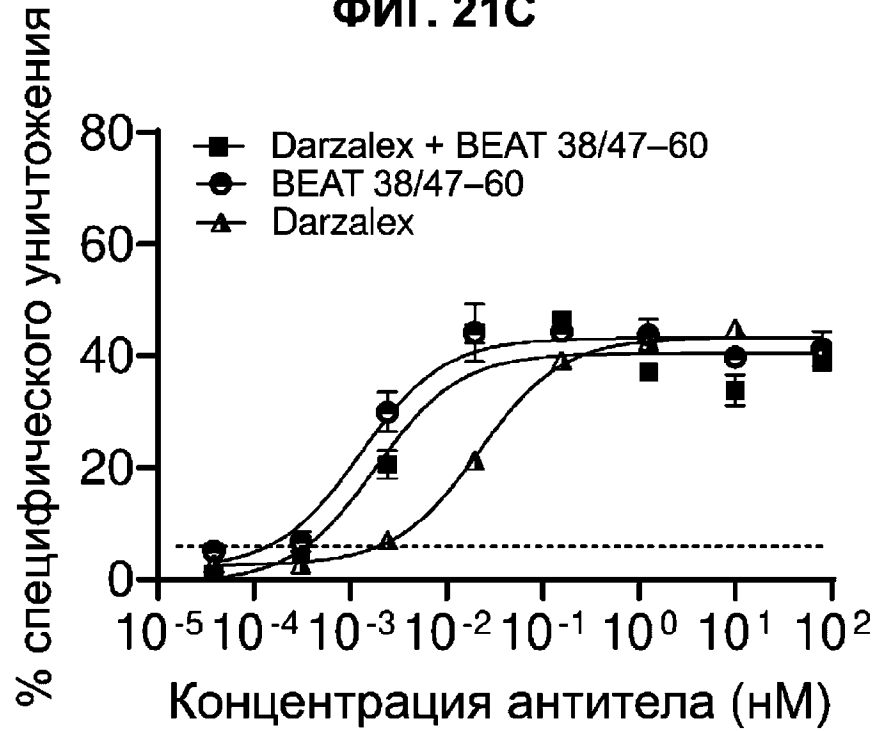
ФИГ. 21А



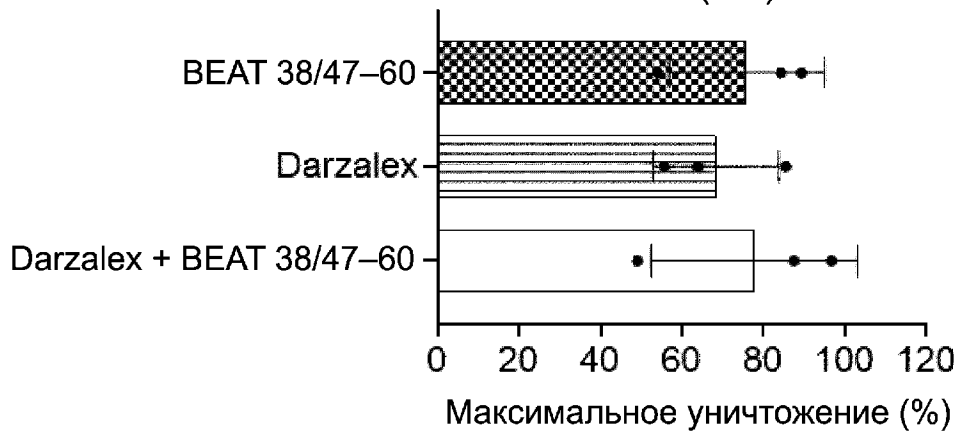
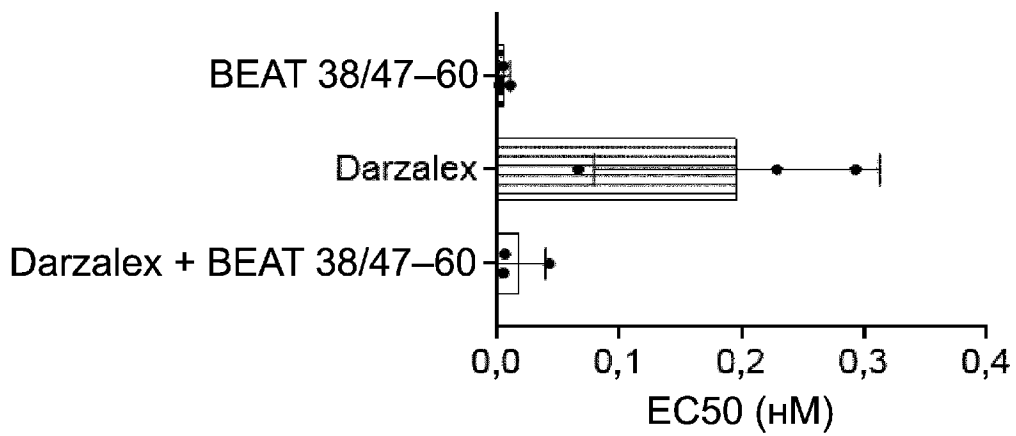
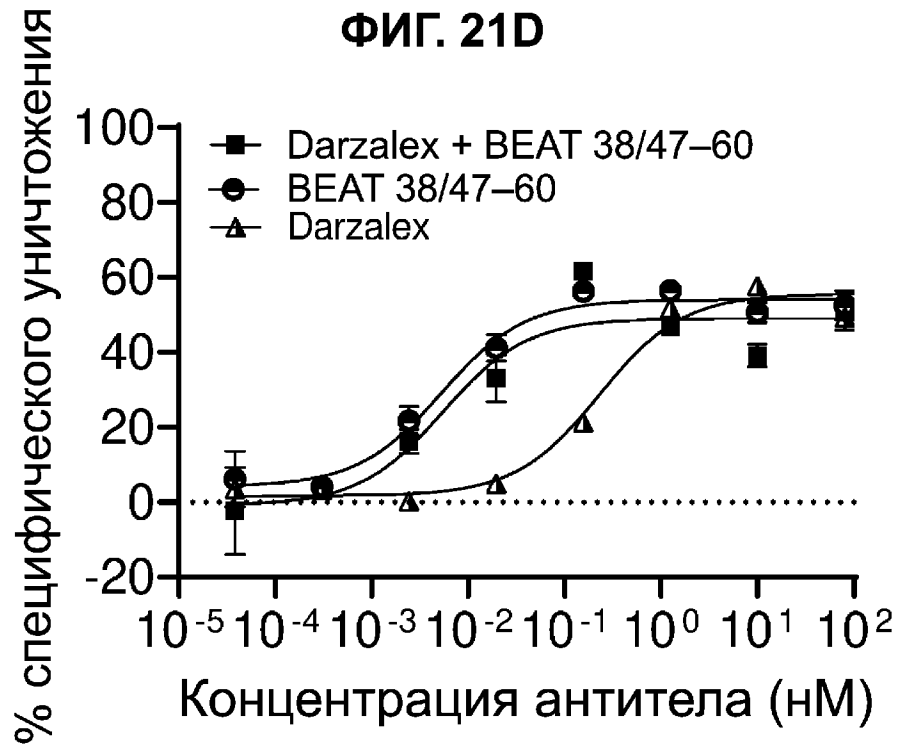
ФИГ. 21В



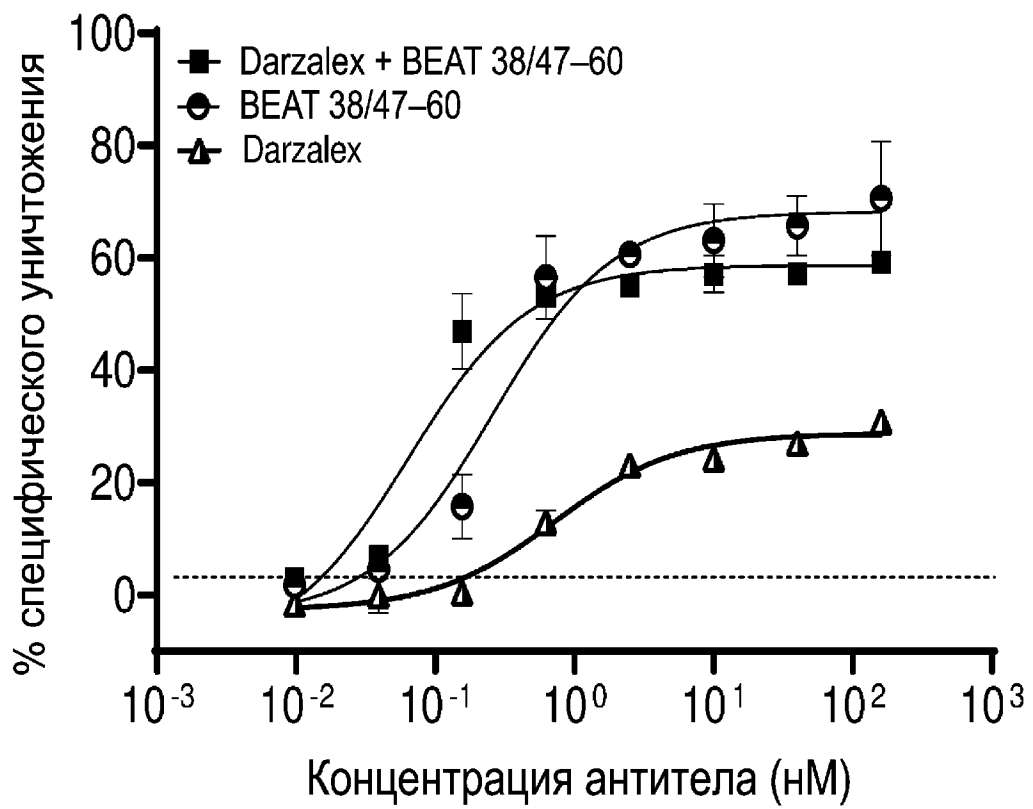
ФИГ. 21С



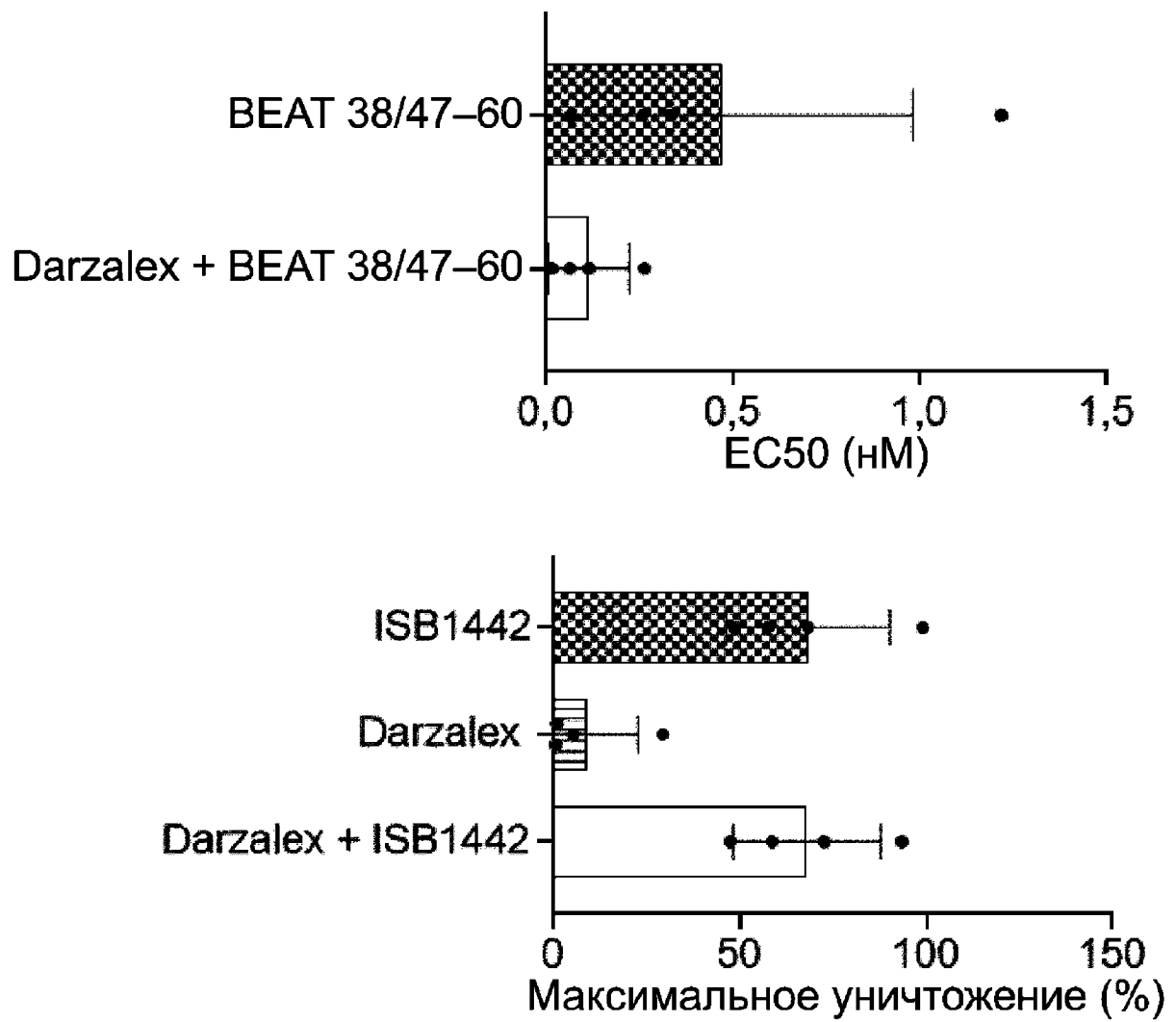
ФИГ. 21D



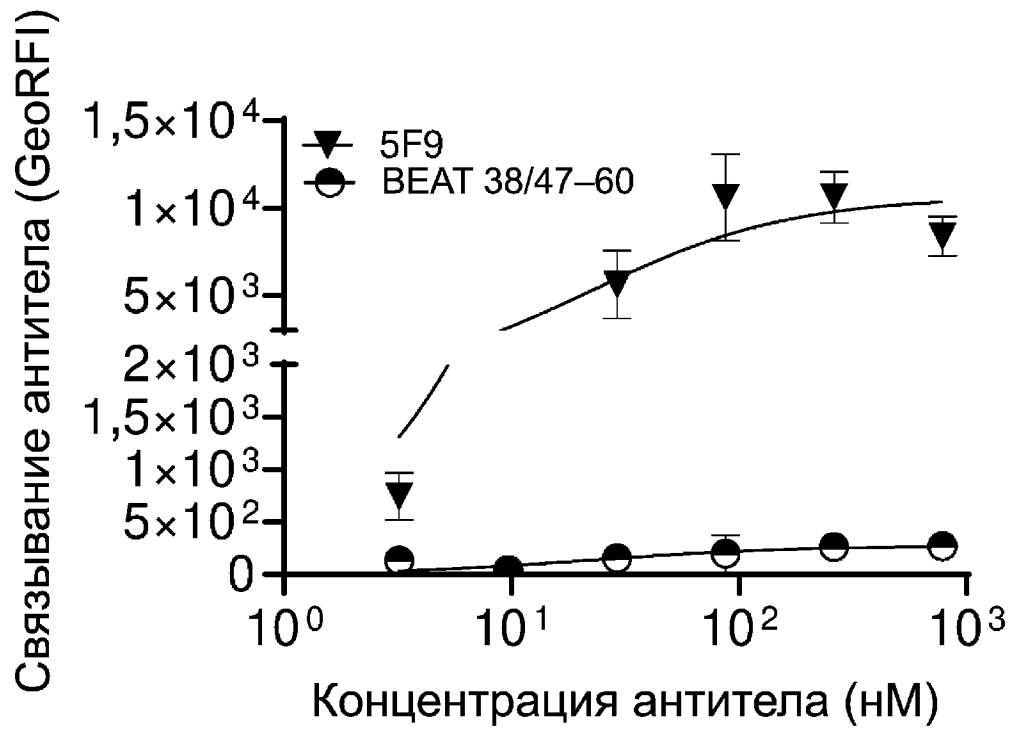
ФИГ. 21Е



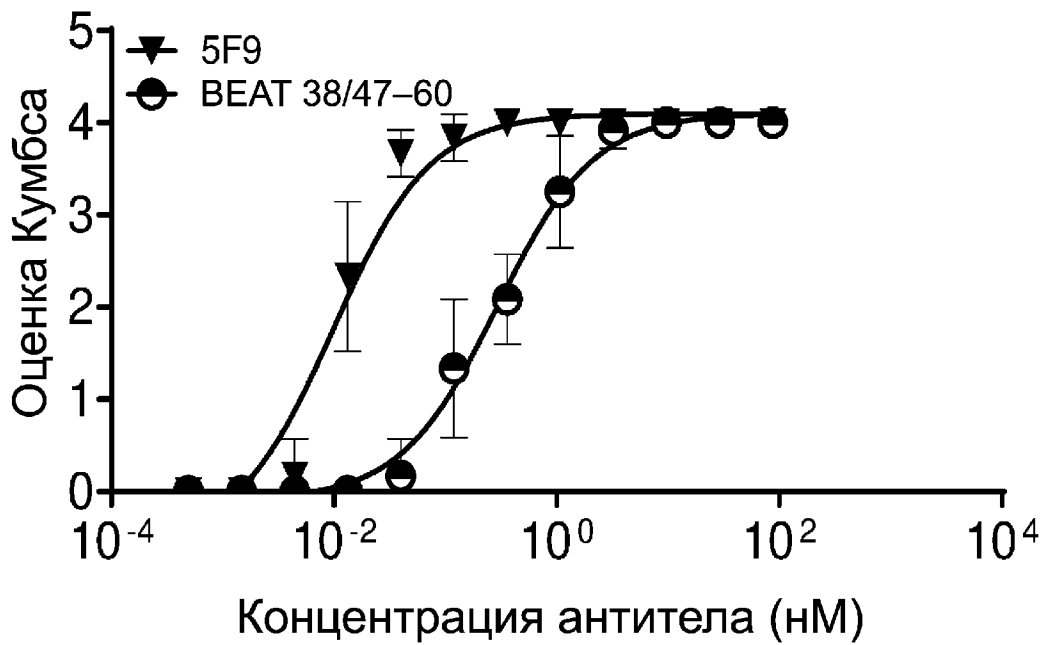
ФИГ. 21F

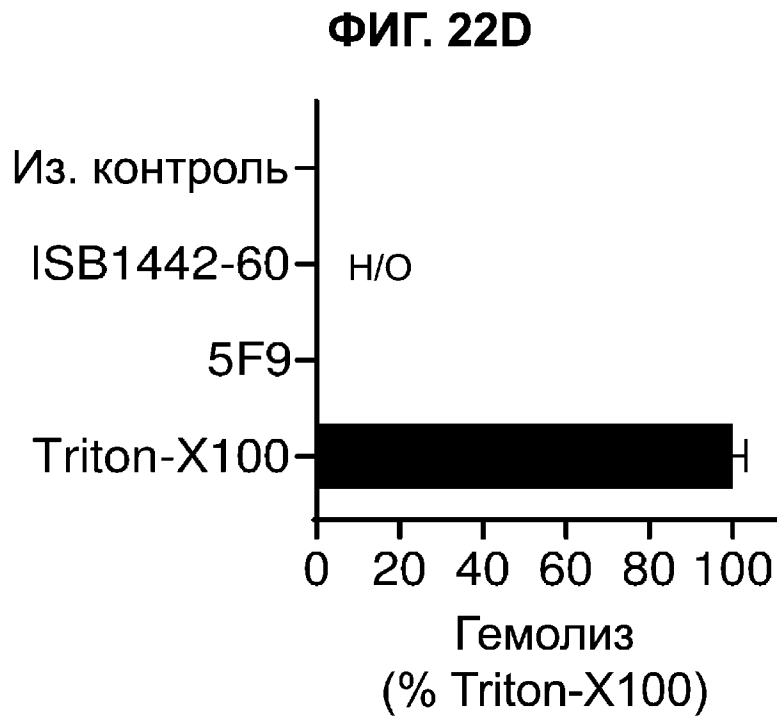
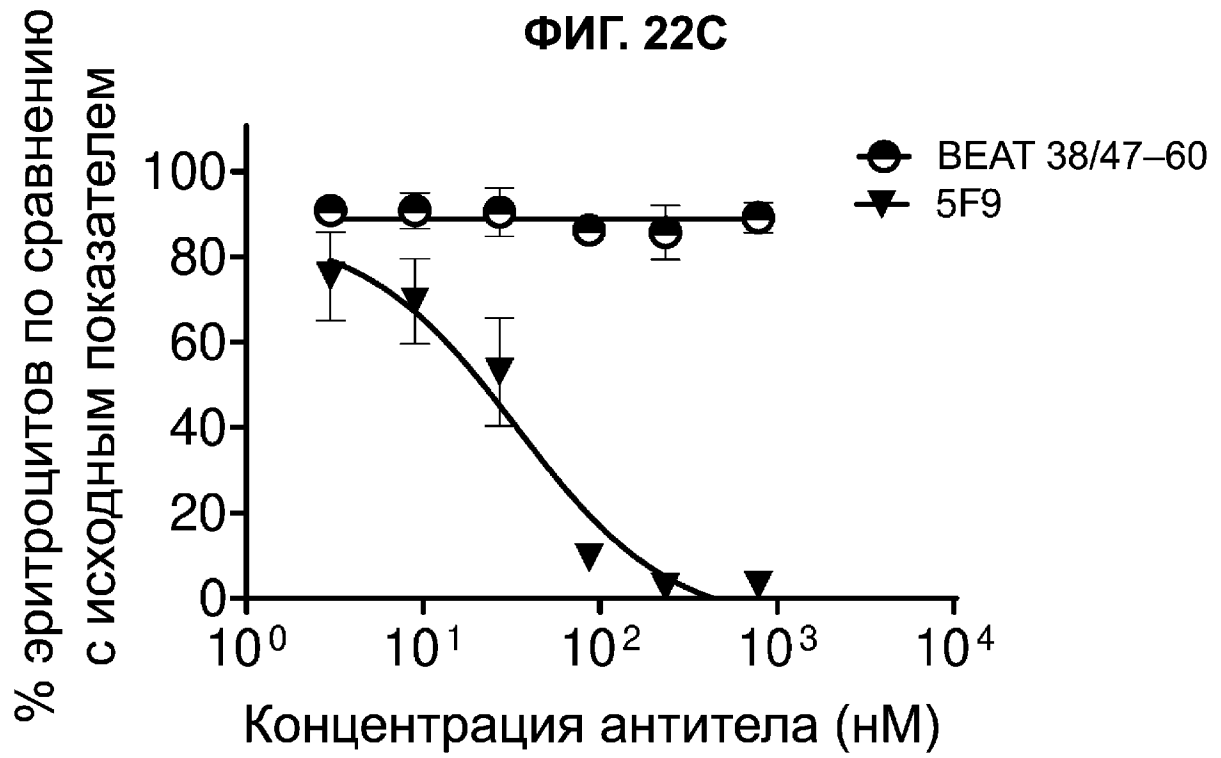


ФИГ. 22А

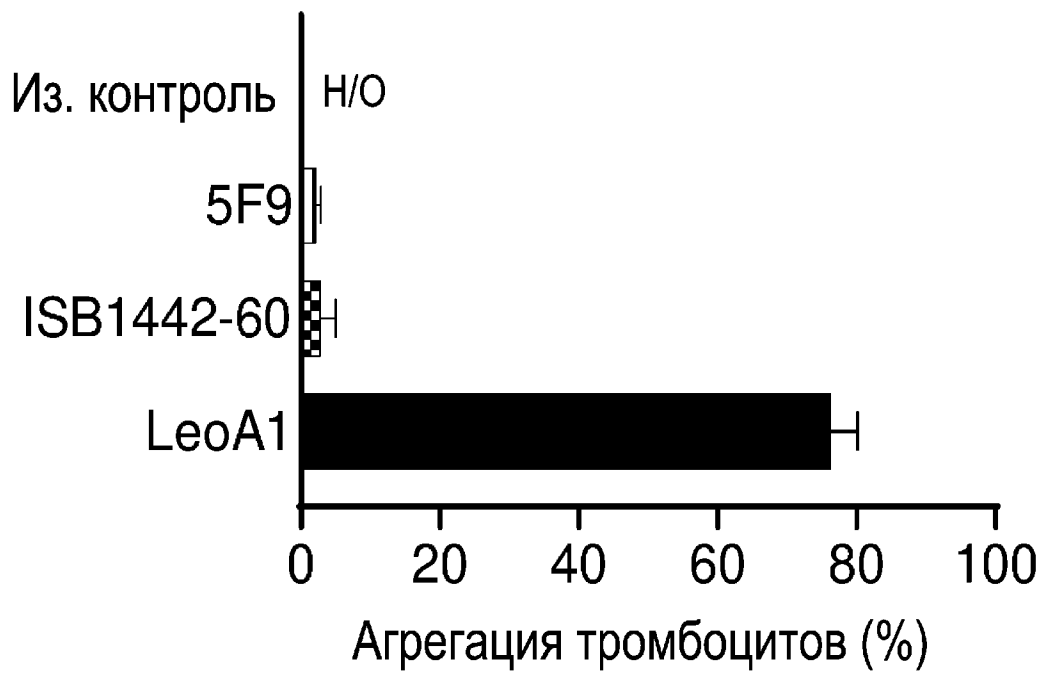


ФИГ. 22В

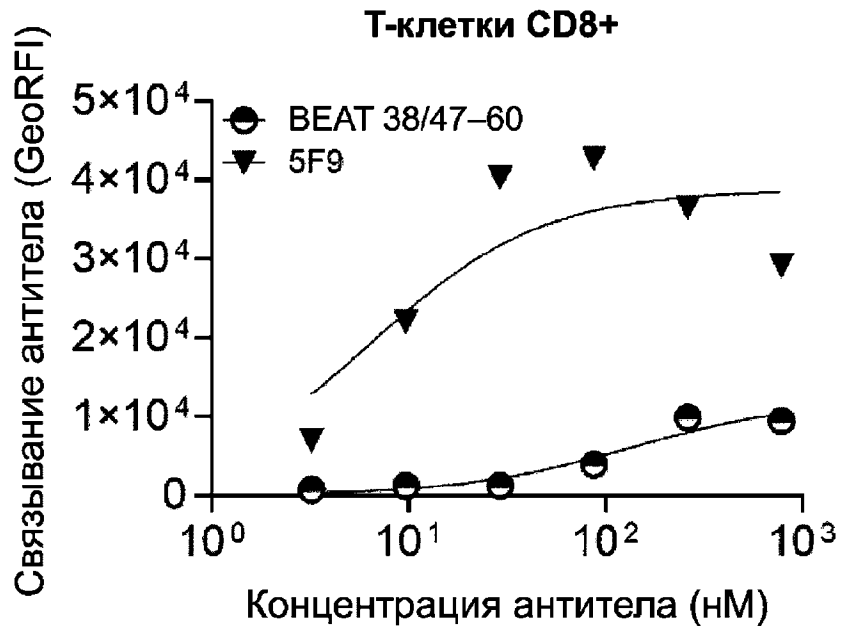




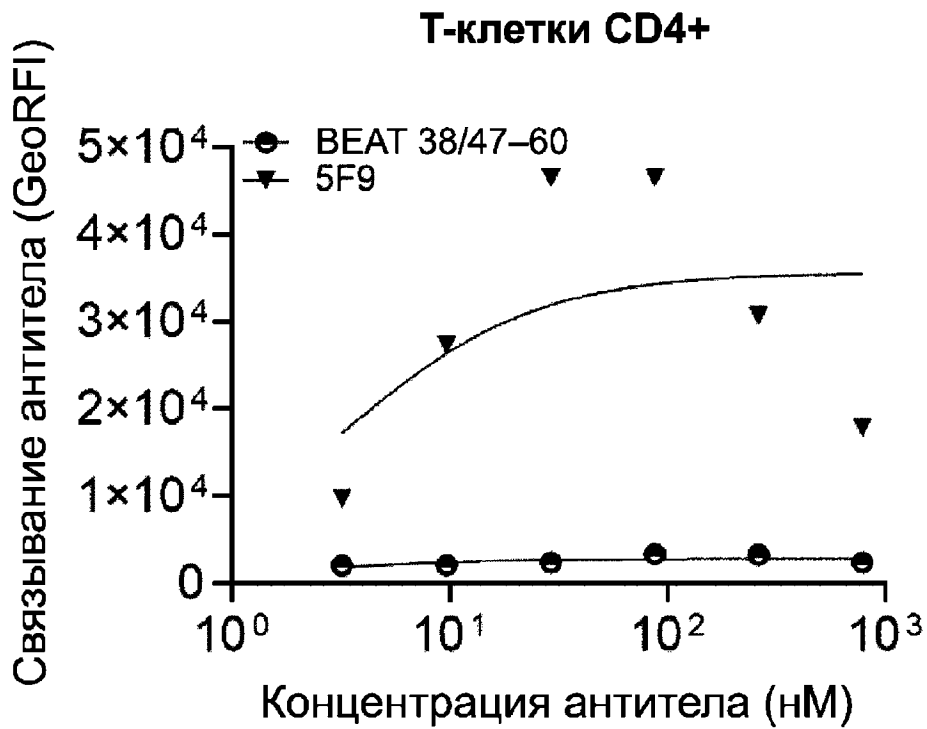
ФИГ. 22Е



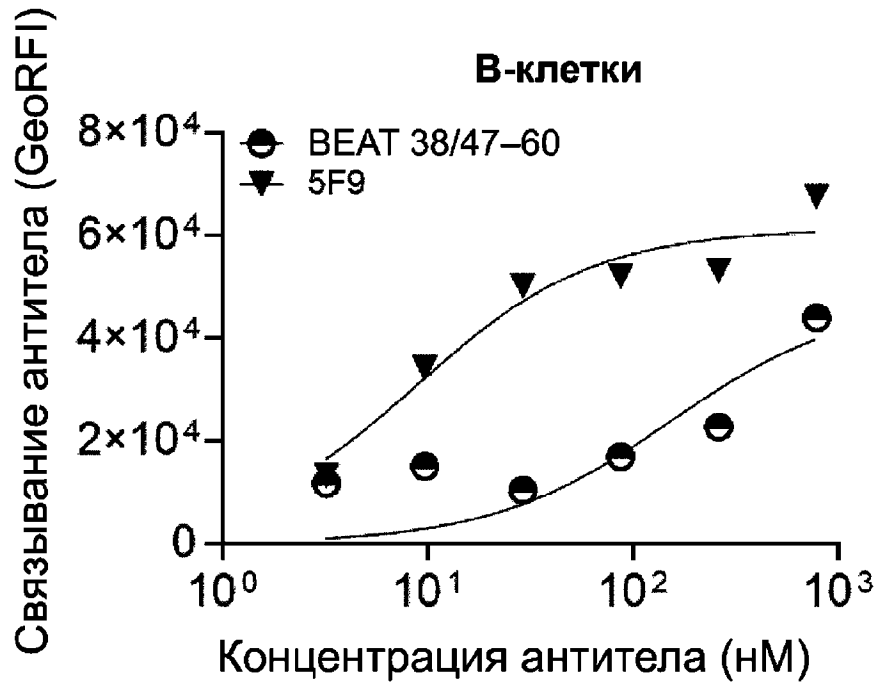
ФИГ. 23А



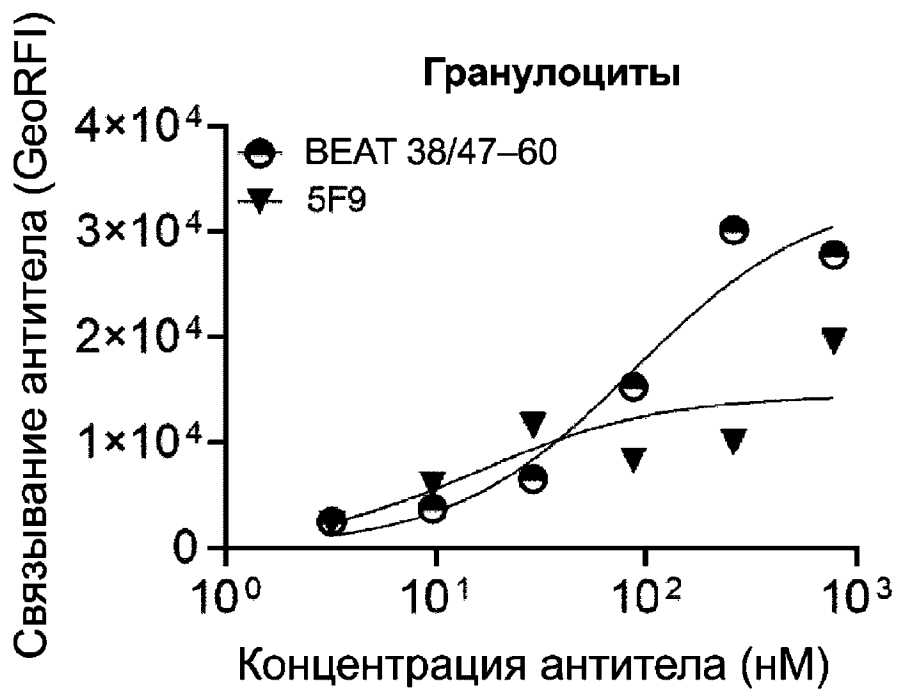
ФИГ. 23В



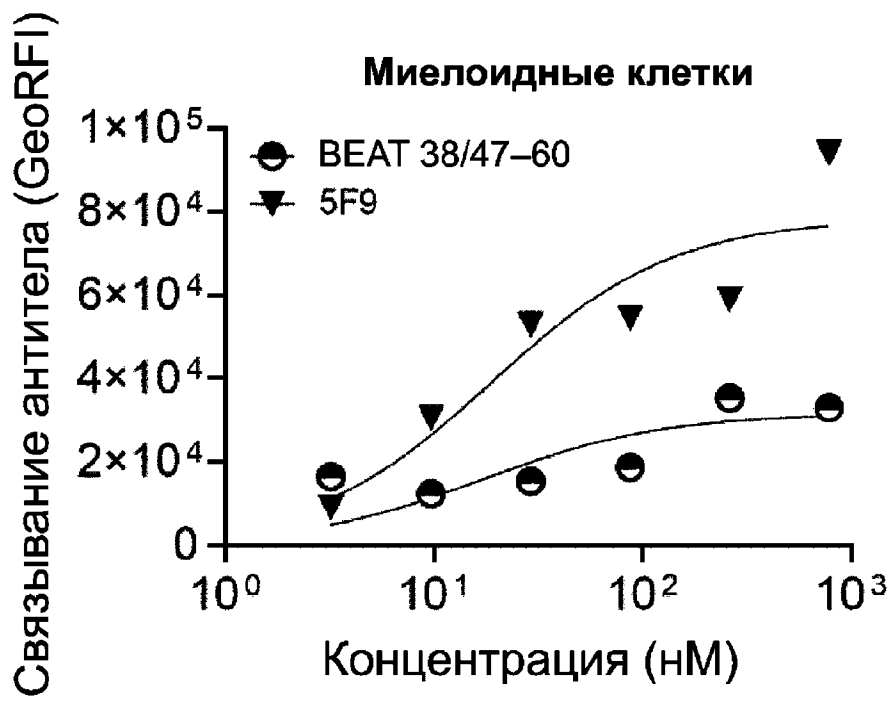
ФИГ. 23С



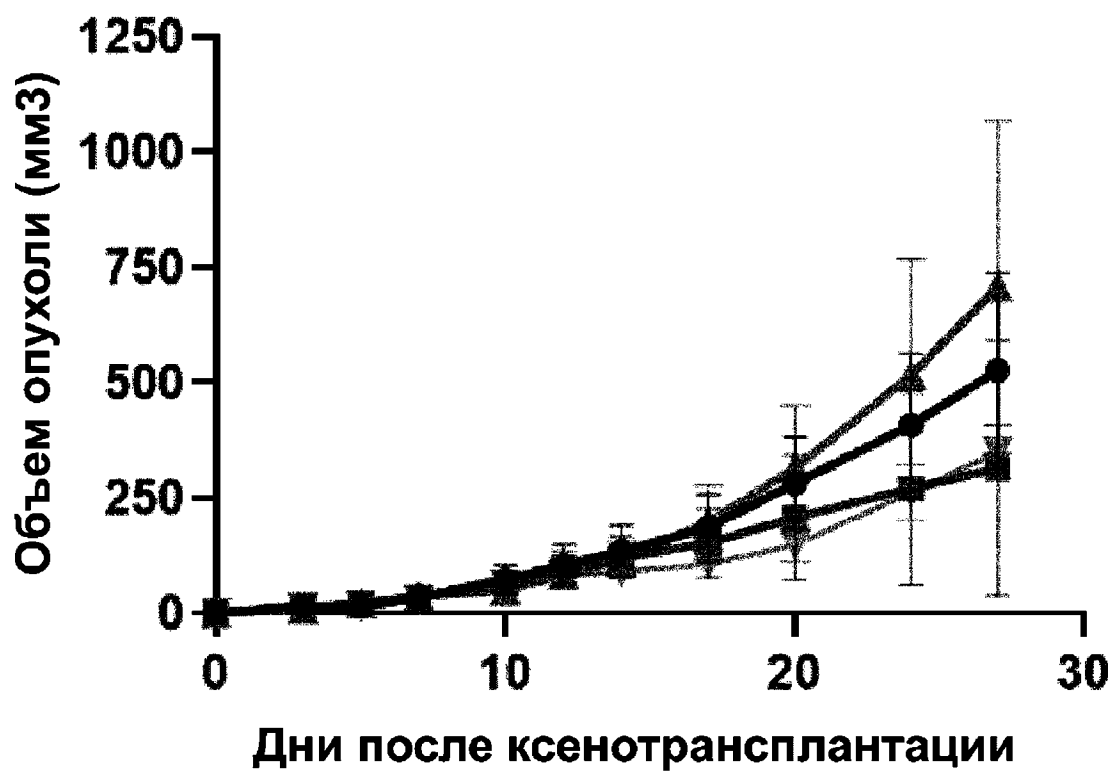
ФИГ. 23D



ФИГ. 23Е

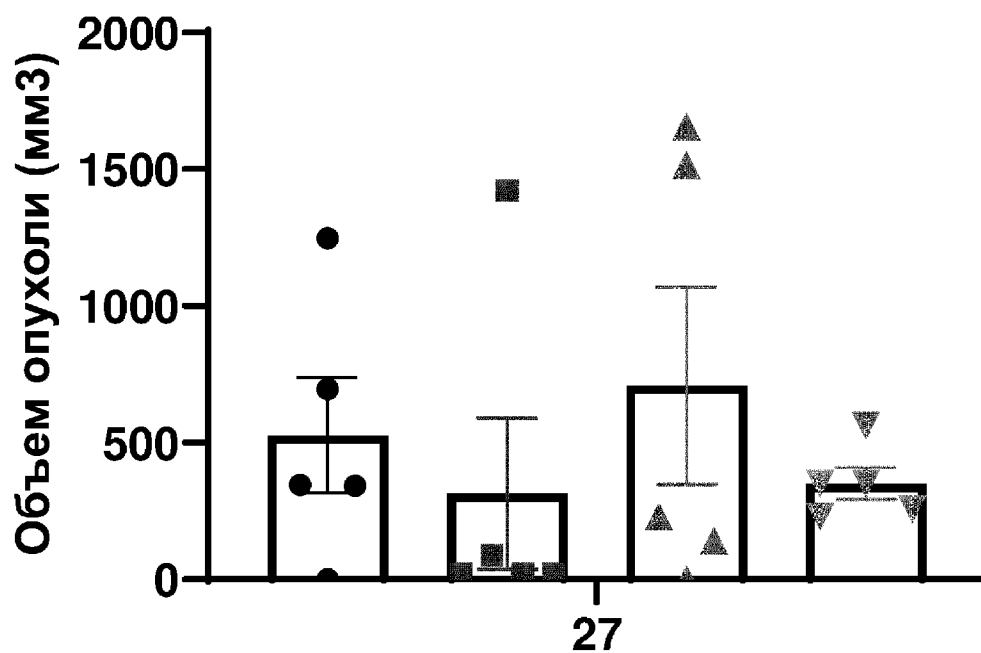


ФИГ. 24А

Дозозависимый ответ BEAT
CD38/47–48 в опухолях Raji

- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг

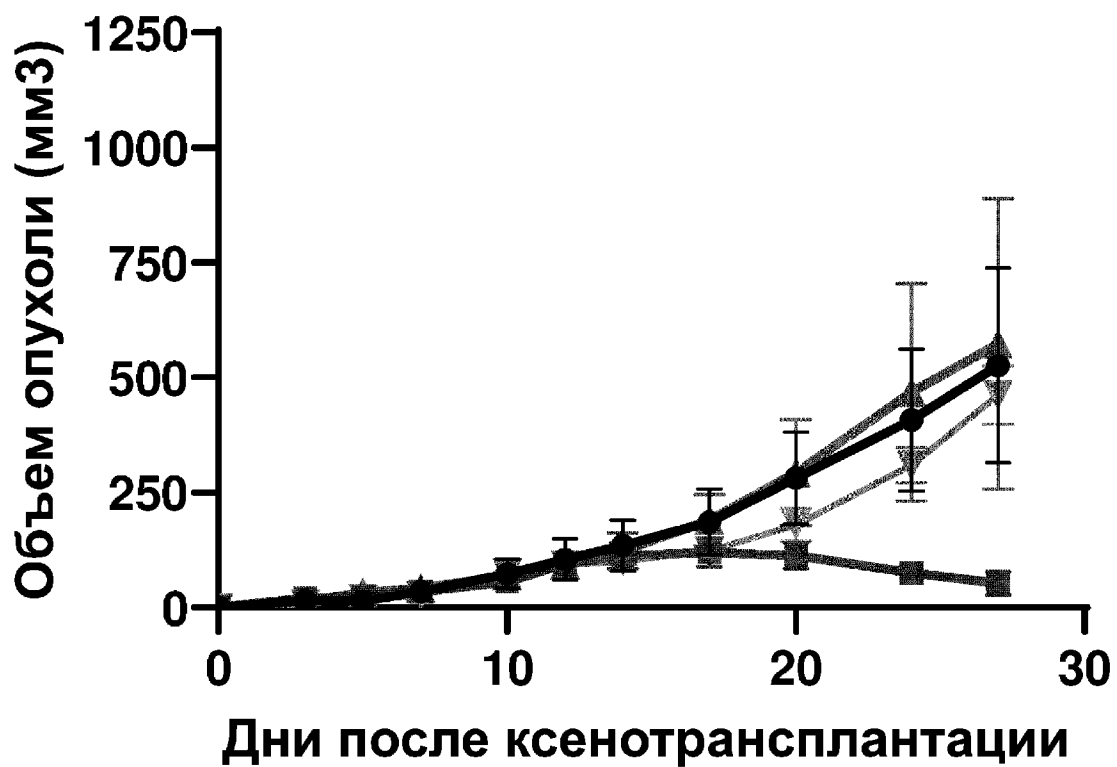
ФИГ. 24В

**Дозозависимый ответ BEAT
CD38/47–48 в день 27**

- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг

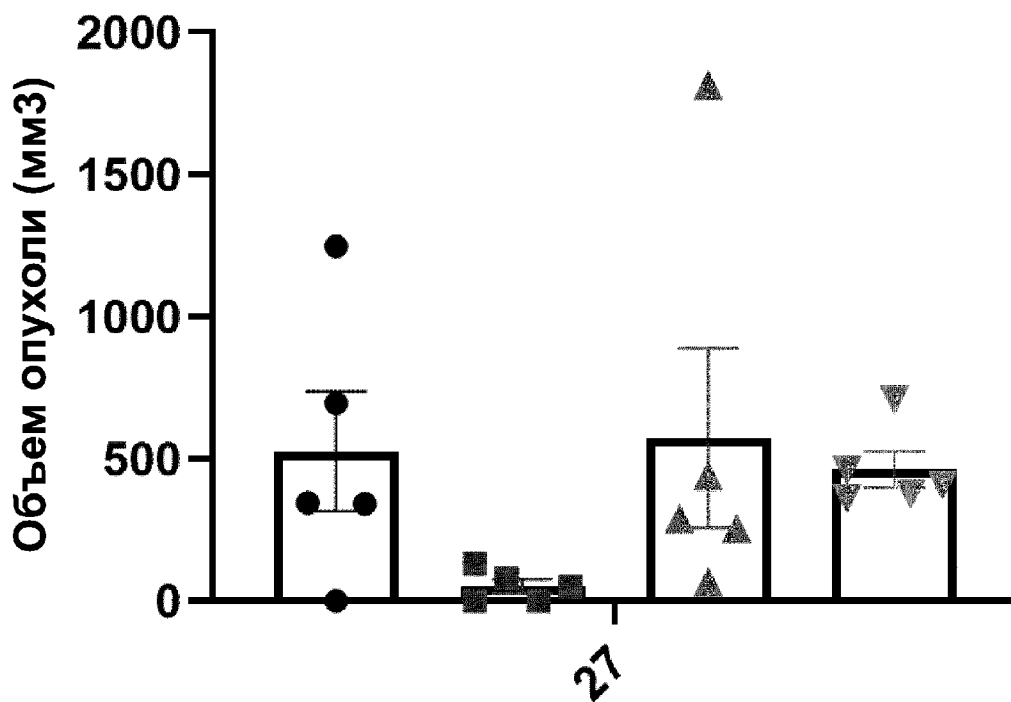
ФИГ. 25А

**Дозозависимый ответ BEAT
CD38/47–60 в опухолях Raji**



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–60 в дозе 10 мг/кг
- ★ BEAT CD38/47–60 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–60 в дозе 0,1 мг/кг

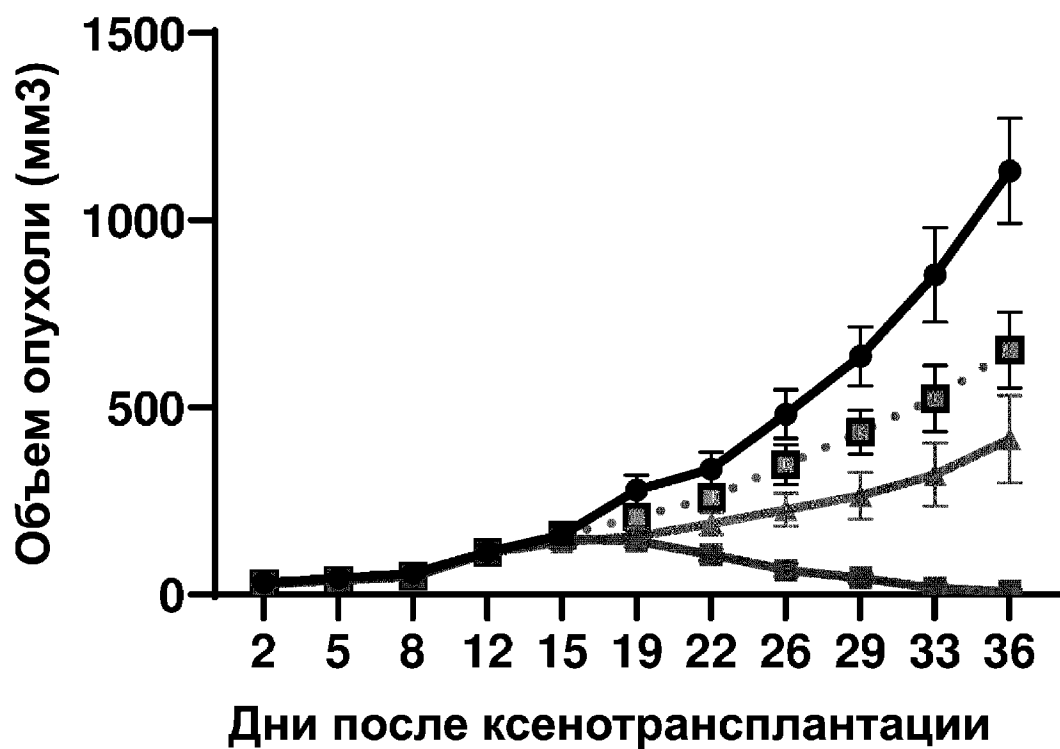
ФИГ. 25В

Дозозависимый ответ BEAT
CD38/47–60 в день 27

- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–60 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47–60 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–60 в дозе 0,1 мг/кг

ФИГ. 26А

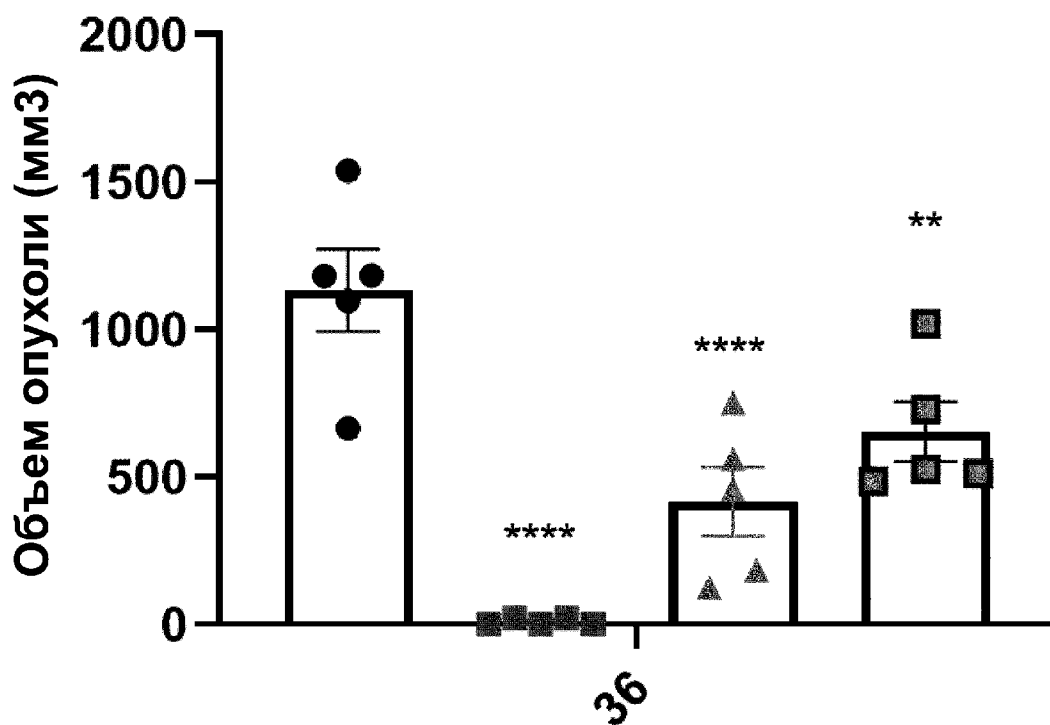
Исследование эффективности BEAT CD38/47–48 в опухолях Raji



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48
- ▲ BEAT CD38/47–59
- Darzalex

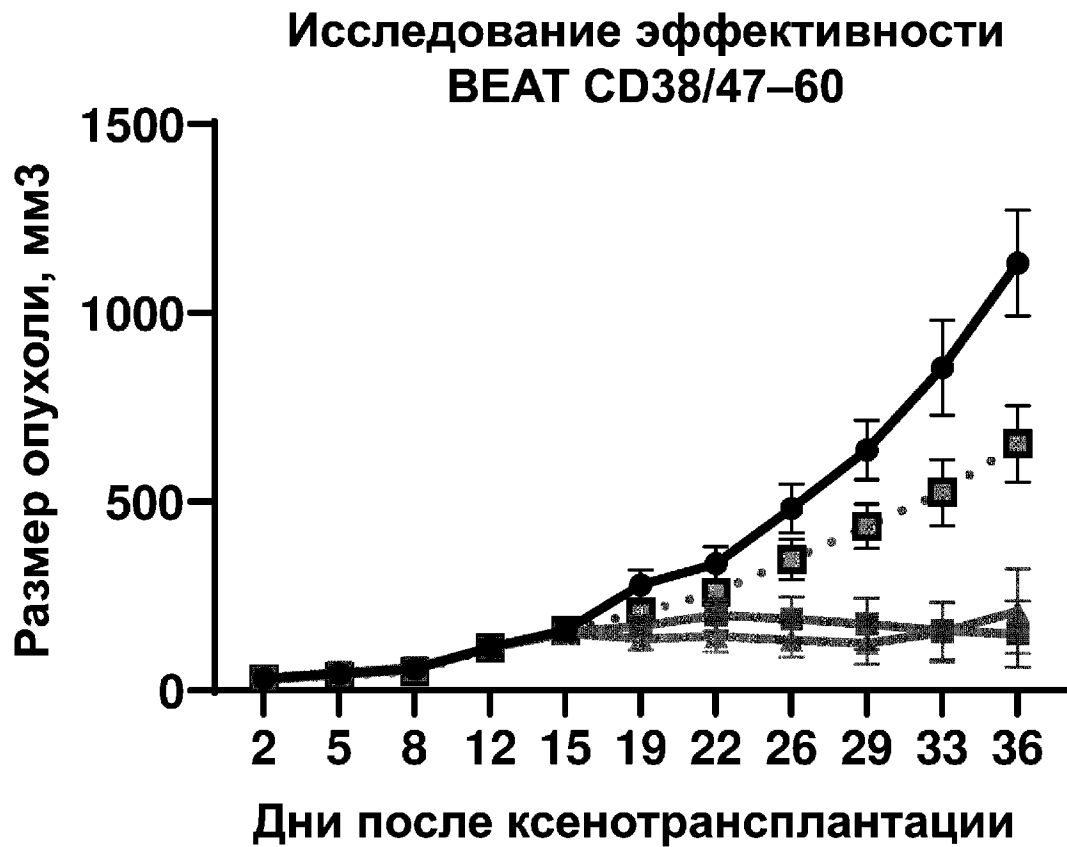
ФИГ. 26В

Исследование эффективности
BEAT CD38/47–48 в день 36



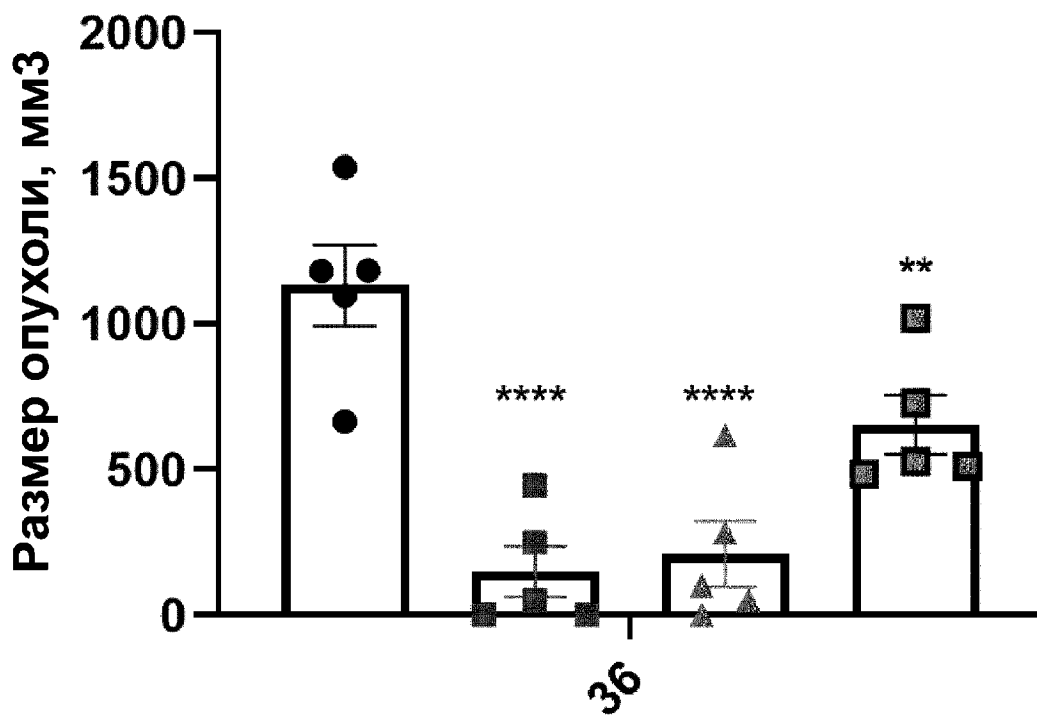
- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48
- ▲ BEAT CD38/47–59
- Darzalex

ФИГ. 27А



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47-60
- ▲ BEAT CD38/47-79
- Darzalex

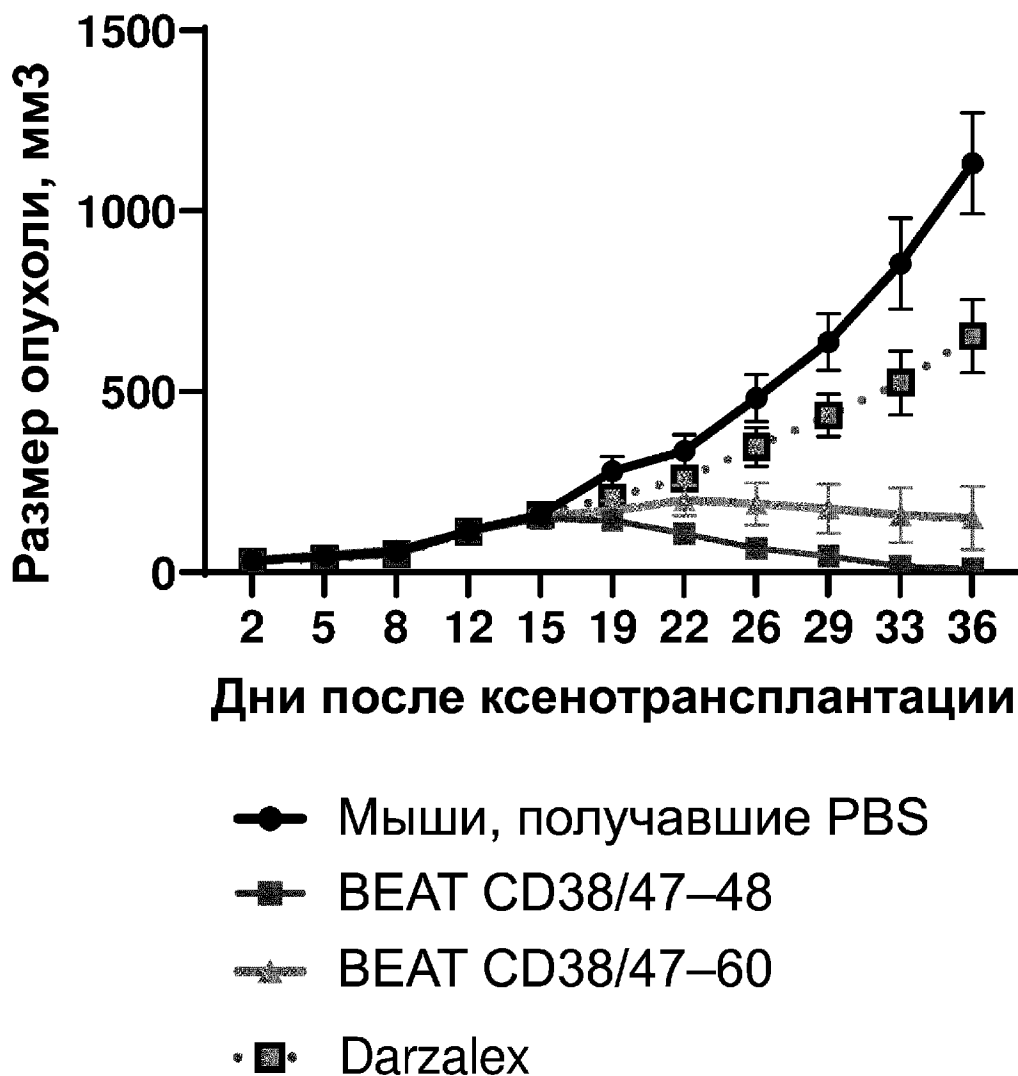
ФИГ. 27В

Исследование эффективности
BEAT CD38/47–60 в день 36

- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–60
- ▲ BEAT CD38/47–79
- Darzalex

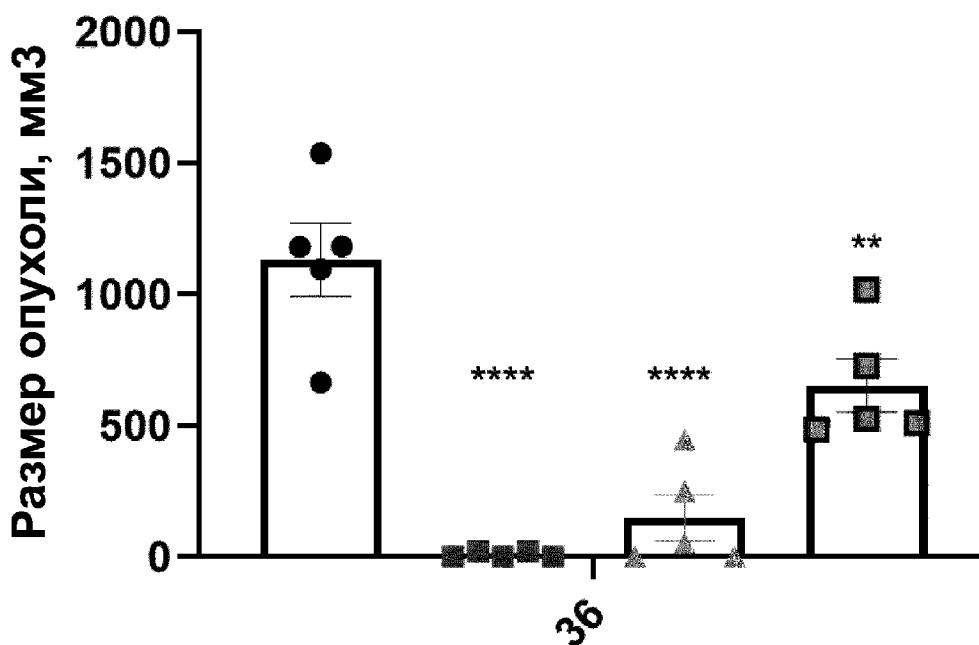
ФИГ. 28А

Исследование эффективности
BEAT CD38/47–48 по сравнению с
BEAT CD38/47–60 в опухолях Raji



ФИГ. 28В

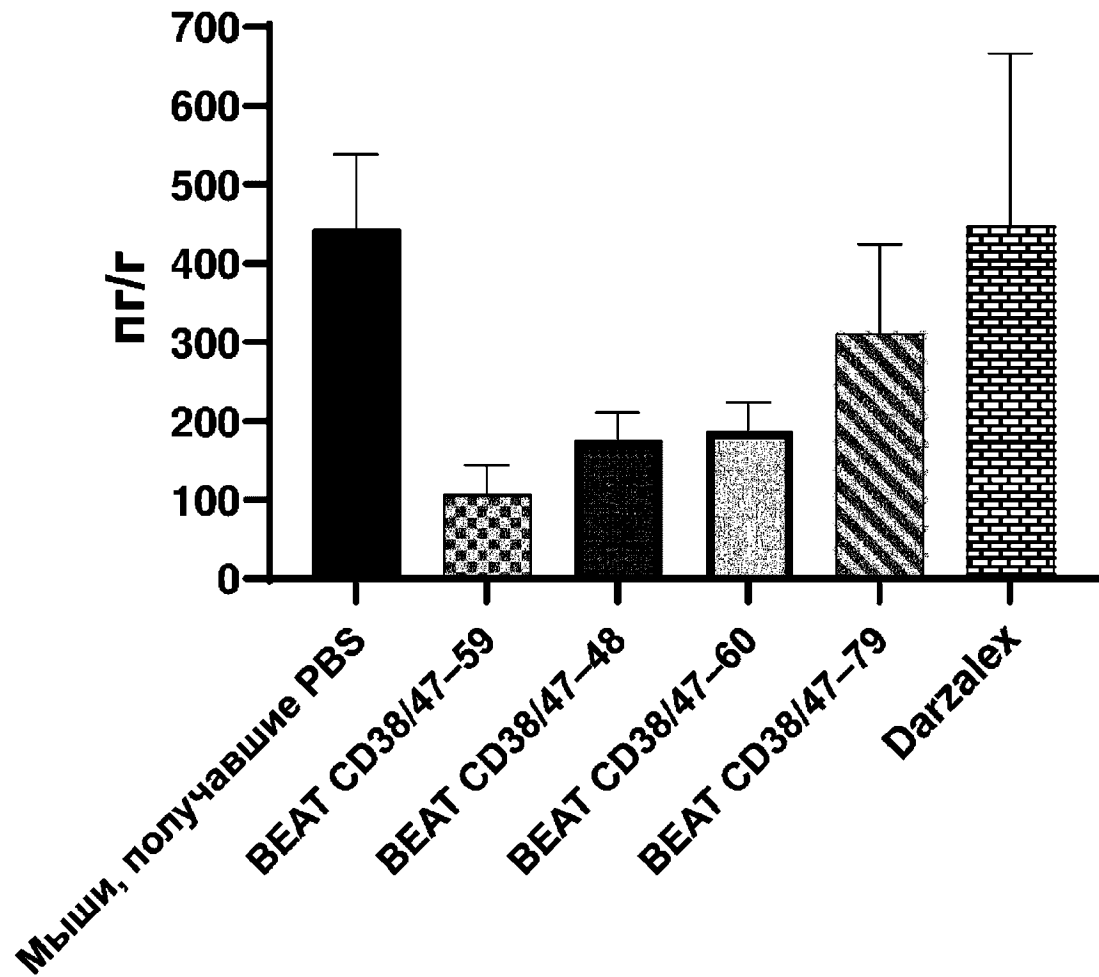
Исследование эффективности
BEAT CD38/47–48 по сравнению с
BEAT CD38/47–60 в день 36



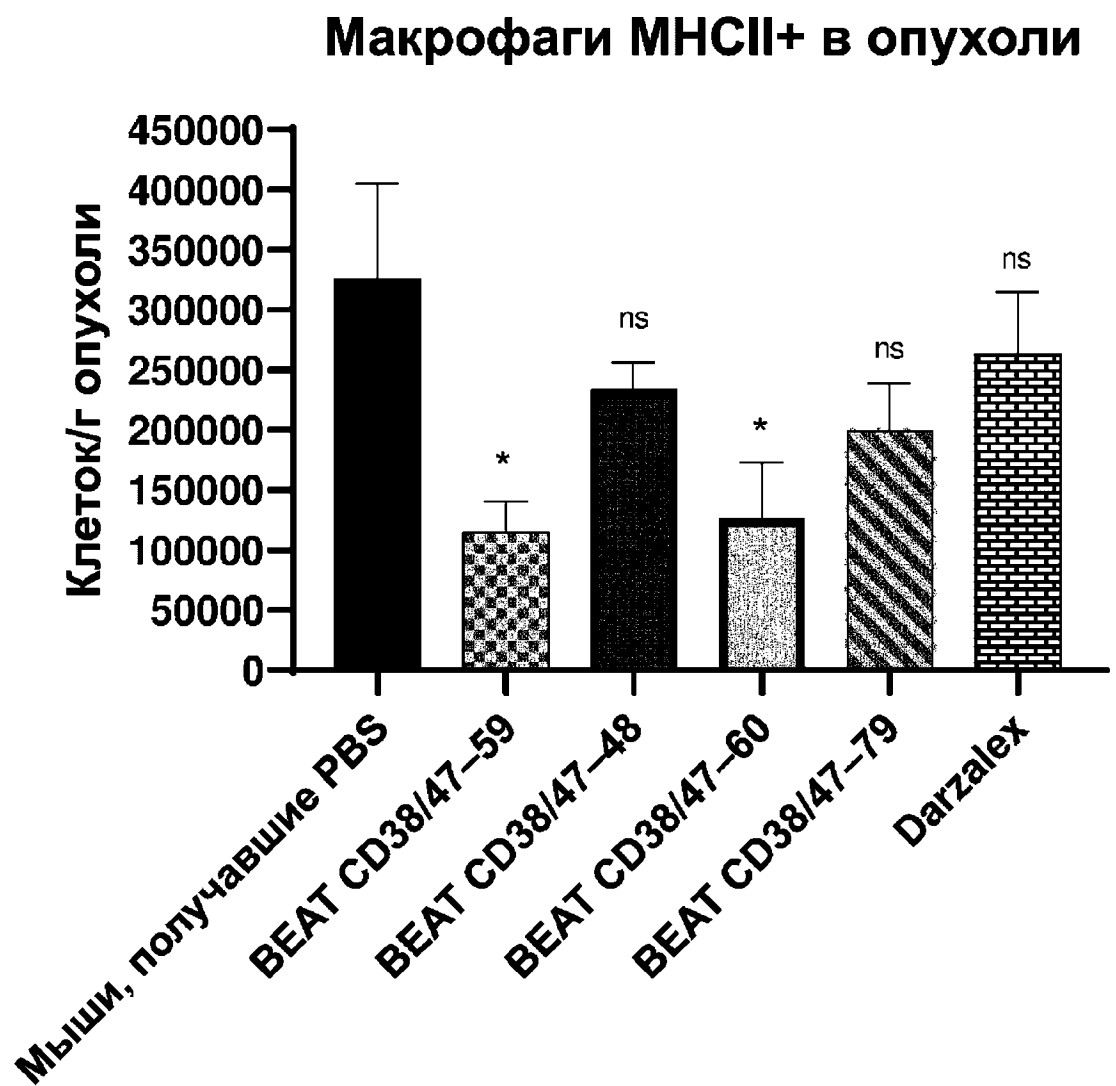
- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48
- ▲ BEAT CD38/47–60
- Darzalex

ФИГ. 29А

Уровни IL-1b в опухоли

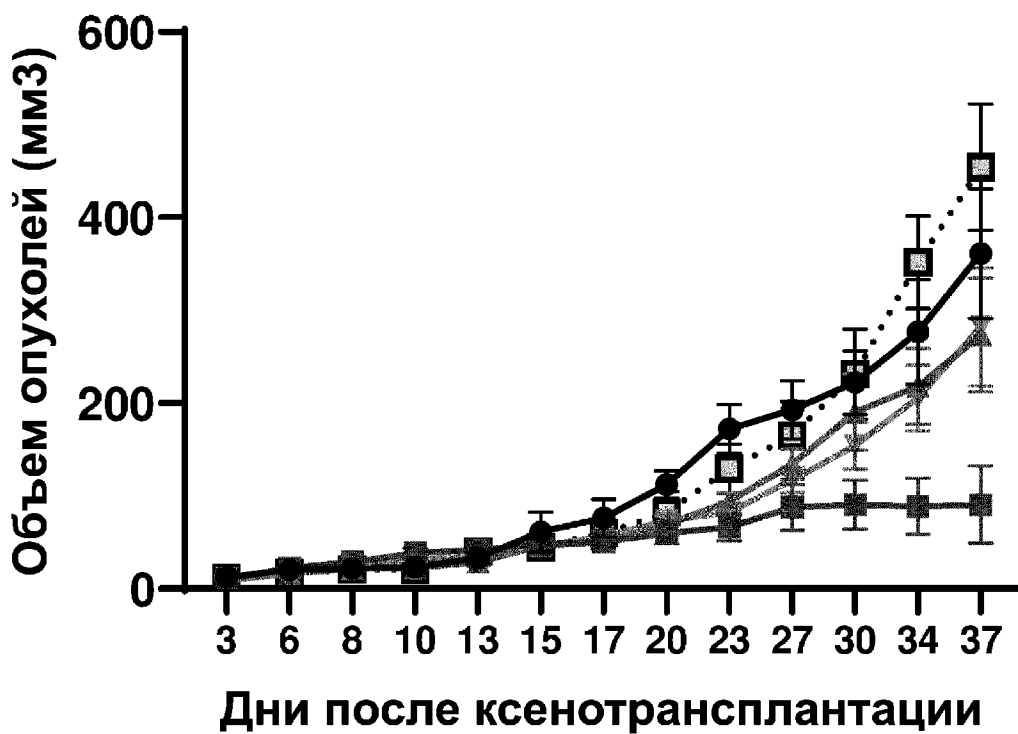


ФИГ. 29В



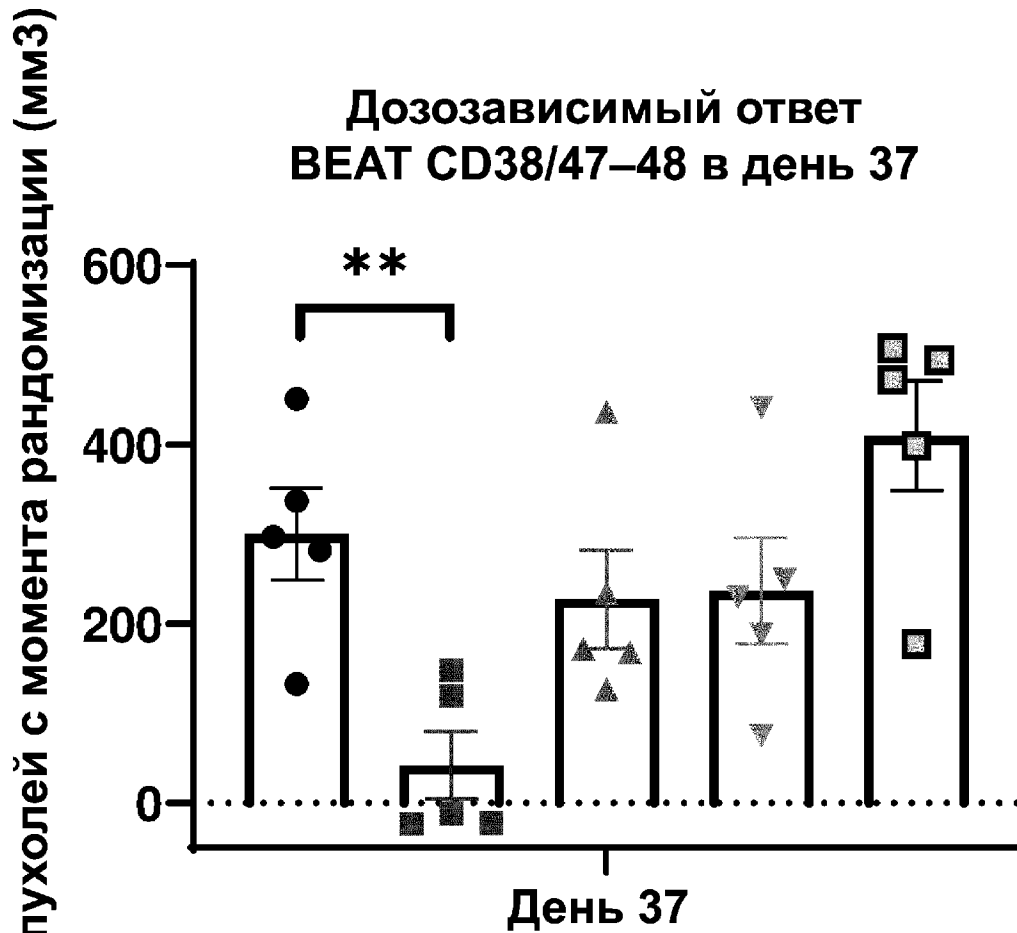
ФИГ. 30А

Дозозависимый ответ BEAT
CD38/47–48 в опухолях KMS-12-BM



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг
- ◻ Darzalex в дозе 16 мг/кг

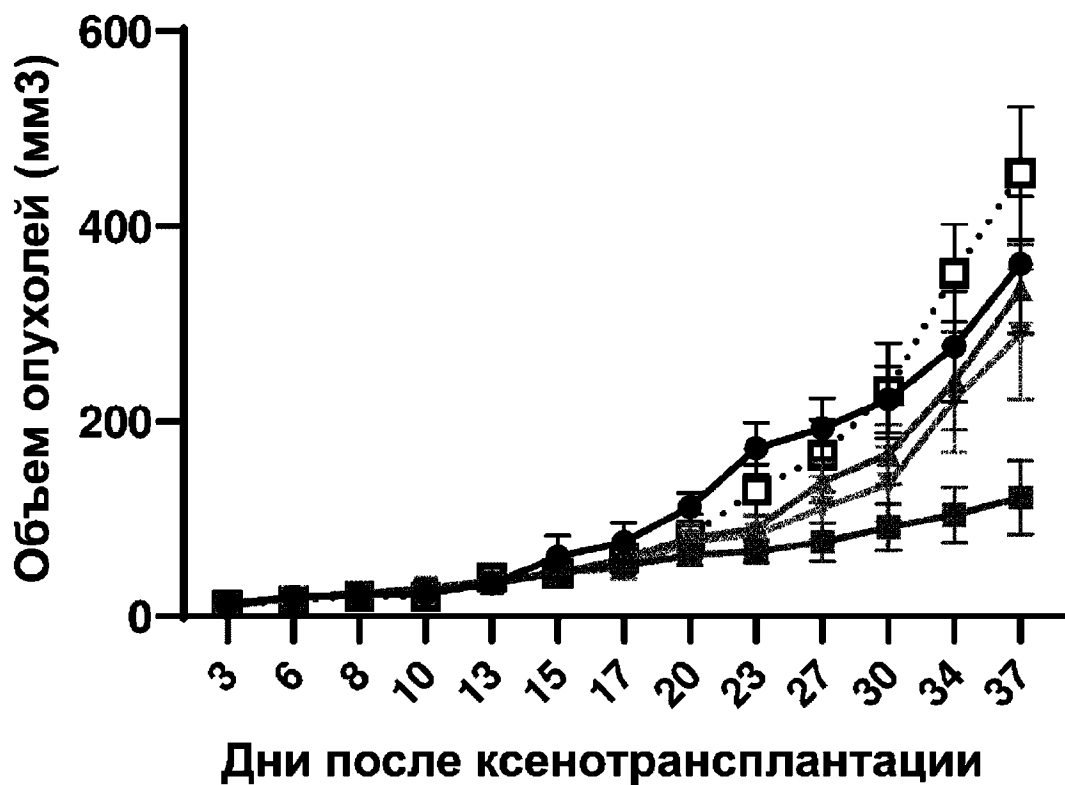
ФИГ. 30В



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47–48 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47–48 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47–48 в дозе 0,1 мг/кг
- ▣ Darzalex в дозе 16 мг/кг

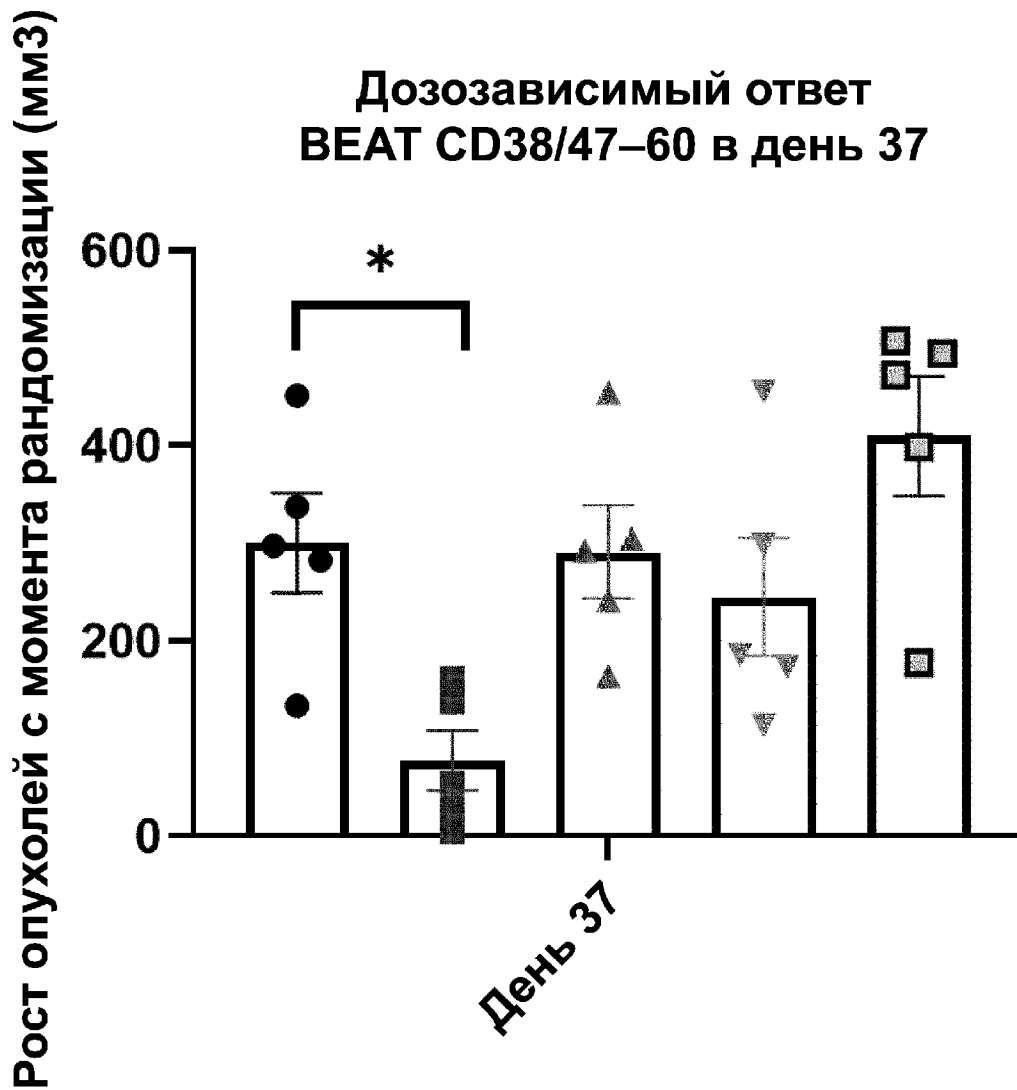
ФИГ. 31А

Дозозависимый ответ
BEAT CD38/47-60 в опухолях KMS-12-ВМ



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг
- Darzalex в дозе 16 мг/кг

ФИГ. 31В



- Мыши, получавшие PBS
- BEAT CD38/47-60 в дозе 10 мг/кг
- ▲ BEAT CD38/47-60 в дозе 1 мг/кг
- ▼ BEAT CD38/47-60 в дозе 0,1 мг/кг
- ▣ Darzalex в дозе 16 мг/кг