

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046105**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
201890513

(22) Дата подачи заявки
2016.08.16

(54) **АНТИТЕЛА К ВСМА, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ВСМА И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/206,246**(32) **2015.08.17**(33) **US**(43) **2018.11.30**(86) **PCT/US2016/047146**(87) **WO 2017/031104 2017.02.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Болдуин Эрик Томас, Пауэрс
Гордон Д., Кардозу Роза Мария
Фернандес, Аттар Рикардо, Годе
Франсуа, Пилларисетти Кодандарам
(US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.
(RU)**

(56) DATABASE Geneseq [online], 17 January 2013 (2013-01-17), "Anti-CD3 epsilon humanized antibody VL region coding gene, SEQ ID 55", XP002762973, retrieved from EBI accession № GSN:BAG88459, database accession № BAG88459, the whole document

DATABASE Geneseq [online], 11 April 2013 (2013-04-11), "Anti-HA mAb (CL860UCA) light chain variable region coding gene, SEQ 5", XP002762974, retrieved from EBI accession № GSN:BAK30778, database accession № BAK30778, the whole document

DATABASE Geneseq [online], 4 December 2014 (2014-12-04), "Anti-CD3 variant humanized antibody VH (XENP11810 H1.15_L1.4), SEQ 57", XP002762975, retrieved from EBI accession № GSP:BBP23340, database accession № BBP23340, the whole document

WO-A1-2013072415

(57) В изобретении предлагаются антитела, иммуноспецифически связывающиеся с ВСМА. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны способы применения предложенных антител. Например, предложенные антитела можно использовать для диагностики, лечения или контроля прогрессирования, обратного развития или стабильности течения рака, экспрессирующего ВСМА; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим ВСМА, и, следовательно, ответит ли он на лечение ВСМА-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к ВСМА и CD3, описанными в изобретении.

046105
B1

046105
B1

Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/206246, поданной 17 августа 2015 г., которая в полном объеме включена в настоящий документ путем ссылки.

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 15 августа 2016 г., называется PRD3383USNP SL.txt и имеет размер 87341 байт.

Область техники

Изобретение, представленное в настоящем документе, относится к моноклональным антителам, которые иммуноспецифически связываются с антигеном созревания В-клетки (BCMA), мультиспецифическим антителам, которые иммуноспецифически связываются с BCMA и кластером дифференцировки 3 (CD3), и способам продуцирования и применения описанных антител.

Предпосылки создания изобретения

Антиген созревания В-клеток, также известный как BCMA, CD269, TNFRSF17 (UniProt Q02223), является представителем надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, который предпочтительно экспрессируется в дифференцированных плазмочитах [Laabi et al. (1992), EMBO J., 11(11):3897-3904; Madry et al. (1998), Int. Immunol., 10(11):1693-1702]. BCMA представляет собой гликозилированный трансмембранный белок I типа, который участвует в созревании, росте и выживании В-клеток. BCMA является рецептором для двух лигандов надсемейства TNF: APRIL (индуцирующий пролиферацию лиганд, CD256, TNFSF13), лиганд с высоким сродством к BCMA, и фактор активации В-клеток BAFF (THANK, BlyS, стимулятор В-лимфоцитов, TALL-1 и ZTNF4), лиганд с низким сродством к BCMA. APRIL и BAFF демонстрируют структурную схожесть и имеют перекрывающиеся участки, но обладают различной специфичностью связывания с рецептором. Кроме того, отрицательный регулятор TACI связывается как с BAFF, так и с APRIL. Связывание посредством координационной связи APRIL и BAFF с BCMA и/или TACI активирует фактор транскрипции NF-κB и увеличивает экспрессию способствующих выживанию членов семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) и уменьшает экспрессию инициирующих апоптоз факторов (например, Bid, Bad, Bik, Bim и т.п.), таким образом ингибируя апоптоз и увеличивая выживаемость. Такое комбинированное действие стимулирует дифференцировку, пролиферацию и жизнеспособность В-клеток и продукцию антител (как описано в обзорной статье Rickert R.C. et al., Immunol. Rev. (2011), 244(1):115-133). BCMA также способствует росту и выживанию злокачественных человеческих В-клеток, включая клетки множественной миеломы (ММ), что согласуется с вышеописанными данными. В соответствии с работой Novak et al. клеточные линии ММ и свежееизолированные клетки ММ экспрессируют BCMA и белок TACI и обеспечивают изменяющуюся экспрессию белка BAFF-R на своих клеточных поверхностях (Novak et al. (2004), Blood, 103(2):689-694).

Множественная миелома (ММ) представляет собой вторую по распространенности гематологическую злокачественную опухоль и составляет 2% от всех случаев смерти от рака. ММ представляет собой гетерогенное заболевание и вызывается чаще всего транслокациями хромосом, среди прочего, t(11; 14), t(4; 14), t(8; 14), del(13), del(17) (Drach et al. (1998), Blood, 92(3):802-809; Gertz et al. (2005), Blood, 106(8):2837-2840; Facon et al. (2001), Blood, 97(6):1566-1571). У пациентов с ММ могут возникать различные связанные с заболеванием симптомы по причине инфильтрации костного мозга, деструкцией кости, почечной недостаточности, иммунодефицита и психологического давления в связи с диагнозом рака. По состоянию на 2006 г. 5-летняя выживаемость при ММ составляла приблизительно 34%, и это указывает на то, что ММ является трудноизлечимым заболеванием, которое в настоящее время не лечится.

Применение антител к BCMA для лечения лимфом и множественной миеломы упоминается в WO 2002066516 и WO 2010104949. Антитела к BCMA описаны, например, в публикации Gras M-P. et al. Int. Immunol., 7 (1995), 1093-1106, WO 200124811 и WO 200124812. Тем не менее, несмотря на тот факт, что BCMA, BAFF-R и TACI, т.е. В-клеточные рецепторы, принадлежащие к надсемейству рецепторов TNF, и их лиганды BAFF и APRIL подвергаются воздействию в способах терапии, направленных на борьбу с раком, все еще сохраняется потребность в дополнительных вариантах лечения таких медицинских состояний.

Изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предлагаются антитела, которые иммуноспецифически связываются с BCMA, и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы применения предложенных антител и антигенсвязывающих фрагментов. Например, BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, обратного развития или стабильности течения рака, экспрессирующего BCMA; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим BCMA, и, следовательно, ответит ли он

на лечение ВСМА-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к ВСМА и CD3, описанными в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении также предлагаются мультиспецифические антитела, иммуноспецифически связывающиеся с ВСМА и CD3, и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3, клетки, экспрессирующие предложенные антитела, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифические антитела. Более того, описаны способы применения предложенных мультиспецифических антител. Например, мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3 можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, обратного развития или стабильности течения рака, экспрессирующего ВСМА; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим ВСМА, и, следовательно, ответит ли он на лечение ВСМА-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к ВСМА×CD3, описанными в настоящем изобретении.

ВСМА-специфические антитела.

В настоящем изобретении описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении ВСМА. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с ВСМА человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с ВСМА человека и ВСМА яванского макака. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из внеклеточного домена (ECD) ВСМА. Это ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут блокировать связывание APRIL с IC₅₀ по меньшей мере 5,9 нМ при измерении посредством твердофазного ИФА.

В табл. 1 представлена сводная информация о примерах некоторых ВСМА-специфических антител, описанных в настоящем изобретении.

Таблица 1

Последовательности CDR mAb, созданные к человеческому ВСМА
(SEQ ID NO для каждой описанной последовательности приведены в скобках)

№	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB123	SSSYWYG (7)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB176	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB177	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

В некоторых вариантах осуществления предлагается ВСМА-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается ВСМА-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1.

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем изобретении,

бретении, включают в себя антитела с описанными особенностями переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Антитела, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя эти модификации.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств:

- (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc;
- (b) сниженной аффинностью к Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb и/или Fcγ RIIIa;
- (c) сниженной аффинностью к FcγRI;
- (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa;
- (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb;
- (f) сниженной аффинностью к Fcγ RIIIb; или
- (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены K409R, S228P, L234A и L235A в области Fc. Антитела, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления описанные антитела способны ингибировать связывание с APRIL с IC₅₀ 5,9 нМ при измерении посредством твердофазного ИФА.

В некоторых вариантах осуществления описанные антитела связываются с ВСМА-положительными клеточными линиями множественной миеломы.

Наряду с описанными ВСМА-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E.coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками.

Способы применения ВСМА-специфических антител.

Кроме того, описаны способы применения описанных ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Конкретные антитела для применения в способах, описанных в данном разделе, включают таковые, имеющие набор CDR, описанный для антител в табл. 1. Например, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться при лечении рака путем блокировки взаимодействий с рецептором ВСМА или там, где антитело конъюгируют с токсином, направляя токсин к раку, экспрессирующему ВСМА. Кроме того, данные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для

- обнаружения наличия ВСМА в биологической пробе, например в крови или сыворотке;
- количественного определения ВСМА в биологической пробе, например в крови или сыворотке;
- диагностики рака, экспрессирующего ВСМА;
- определения способа лечения субъекта, пораженного раком; или
- контроля прогрессирования рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, может представлять собой лимфому, такую как множественная миелома (ММ). Описанные способы можно осуществлять до того, как субъект получит лечение по поводу рака, экспрессирующего ВСМА, например лечение мультиспецифическим антителом к ВСМА и CD3. Кроме того, описанные способы можно осуществлять после того, как субъект получит лечение по поводу рака, экспрессирующего ВСМА, например лечение мультиспецифическим антителом к ВСМА и CD3, описанным в настоящем изобретении.

Описанные способы обнаружения ВСМА в биологической пробе включают воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении.

Описанные способы диагностирования рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта также включа-

ют воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении; однако способы также включают определение количества ВСМА, присутствующего в пробе; сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с известной стандартной или эталонной пробой; и определение того, попадают ли уровни ВСМА субъекта в пределы уровней ВСМА, связанных с раком.

В настоящем изобретении также описаны способы контроля рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта. Описанные способы включают

воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении;

определение количества ВСМА, присутствующего в пробе, при связывании с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, либо с известной стандартной или эталонной пробой, либо с количеством ВСМА в подобной пробе, полученной от субъекта ранее; и

определение того, являются ли уровни ВСМА у субъекта показателями прогрессирования, обратного развития или стабильного течения заболевания на основании разницы количества ВСМА в сравниваемых пробах.

Пробы, полученные от субъектов, представляют собой биологические пробы, например мочу, кровь, сыворотку, плазму, слюну, асцитную жидкость, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки, клетки, не связанные с тканями, ткани, хирургически иссеченную ткань опухоли, материалы биопсии, пробы, полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии или гистологические препараты.

Описанные ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно метить для применения описанными способами или другими способами, известными специалистам в данной области. Например, антитела, описанные в настоящем изобретении, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпитопной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ¹¹¹In-DOТА, ¹¹¹In-диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DTPA), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и бета-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными в данной области.

Наборы ВСМА-специфических антител.

В настоящем изобретении описаны наборы, включающие описанные ВСМА-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении наличия ВСМА в биологической пробе. Соответственно описанные наборы могут включать одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем изобретении.

Мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3.

Перенаправление Т-лимфоцитов к ММ-клеткам, экспрессирующим ВСМА, посредством комплекса TCR/CD3 представляет собой привлекательный альтернативный подход. Комплекс Т-лимфоцитов TCR/CD3 состоит из гетеродимера TCR альфа (α)/бета (β) или TCR гамма (γ)/дельта (δ), экспрессируемого на клеточной поверхности совместно с константными субъединицами CD3, обозначаемыми как гамма (γ), дельта (δ), эpsilon (ε), зета (ζ) и эта (η). Человеческий CD3ε описан как UniProt P077 66 (CD3E_HUMAN).

Антитело к CD3ε, описанное на современном уровне техники, представляет собой SP34 (Yang S.J., The Journal of Immunology (1986), 137, 1097-1100). SP34 реагирует с CD3 человека и примата. SP34 можно приобрести в компании Pharmingen. Дополнительное антитело к CD3, описанное на современном уровне техники, представляет собой UCHT-1 (см. WO 2000041474). Дополнительное антитело к CD3, описанное на современном уровне техники, представляет собой BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; использованное в исследованиях GvHD фазы I/II, Anasetti et al., Transplantation, 54:844 (1992)). SP34 отличается от UCHT-1 и BC-3 тем, что SP-34 распознает эпитоп, присутствующий только на s-цепи CD3 (см. Salmeron et al. (1991), J. Immunol., 147:3047), а UCHT-1 и BC-3 распознает эпитоп, состоящий из s- и u-цепей. Последовательность антитела, идентичная последовательности антитела SP34, описана в WO 2008119565, WO 2008119566, WO 2008119567, WO 2010037836, WO 2010037837 и WO 2010037838. Последовательность, на 96% идентичная вариablyному домену (VH) тяжелой цепи антитела SP34, описана в US 8236308 (WO 2007042261).

Различные биспецифические антитела к CD3 и ВСМА описаны в WO 2007117600, WO 2009132058,

WO 2012066058, WO 2012143498, WO 2013072406, WO 2013072415 и WO 2014122144. Однако в настоящее время отсутствуют данные, описывающие прогрессирование клинических проявлений.

В настоящем изобретении описаны рекомбинантные мультиспецифические антитела, связывающиеся с ВСМА и CD3 ("мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3") и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления предложено рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфическое плечо мультиспецифического антитела связывается с ВСМА человека и/или ВСМА яванского макака. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфическое плечо мультиспецифических антител к ВСМА×CD3 или антигенсвязывающих фрагментов связывается с внеклеточным доменом ВСМА человека. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления предлагается рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, содержащее

- a) первую тяжелую цепь (HC1);
- b) вторую тяжелую цепь (HC2);
- c) первую легкую цепь (LC1); и
- d) вторую легкую цепь (LC2),

причем HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с ВСМА, а HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3; или его биспецифический фрагмент, связывающийся с ВСМА×CD3.

В другом варианте осуществления предлагается рекомбинантная клетка, экспрессирующая антитело или биспецифический связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо (или "ВСМА-специфическое плечо") мультиспецифического антитела к ВСМА×CD3 получено из антитела к ВСМА, описанного в настоящем изобретении (например, из антитела, имеющего последовательности CDR, перечисленные в табл. 1).

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфическое плечо мультиспецифических антител к ВСМА×CD3 или антигенсвязывающих фрагментов представляет собой IgG или его производные. В некоторых вариантах осуществления описанные мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3 способны связываться с ВСМА с константой диссоциации по меньшей мере 0,18 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления описанное мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 не является агонистом. В некоторых вариантах осуществления описанное мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 не влияет на активацию NF-κB в концентрациях ниже 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо (или "CD3-специфическое плечо") мультиспецифического антитела к ВСМА×CD3 получено из мышинового моноклонального антитела SP34, мышинового изоформа IgG3/лямбда (K.R. Abhinandan, A.C. Martin, 2008, Mol. Immunol., 45, 3832-3839). В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо мультиспецифического антитела к ВСМА×CD3 содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, выбранные из табл. 2.

Таблица 2

Тяжелые цепи и легкие цепи CD3-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов

Тяжелая цепь	Легкая цепь
<p>CD3B219 (SEQ ID NO: 55) :</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMIM SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPEPNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNNHYTQKSLSLGK</p>	<p>CD3B219 (SEQ ID NO: 56) :</p> <p>QTVVVTQEPSTLTVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARF SGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYCALWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSPSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVET'TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>
CDR 1: TYAMN (SEQ ID NO: 59)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 62)
CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 60)	CDR 2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 63)
CDR 3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 61)	CDR 3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 64)

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств:

- сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc;
- сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa;
- сниженной аффинностью к FcγRI;
- сниженной аффинностью к FcγRIIa;
- сниженной аффинностью к FcγRIIb;
- сниженной аффинностью к FcγRIIIb; или
- сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG1 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG1, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит в области Fc замены L234A, L235A и F405L. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которых получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG4 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG4, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит в области Fc замены S228P, L234A, L235A, F405L и R409K. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, связывает

CD3ε на первичных человеческих Т-клетках и/или первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, активирует первичные человеческие Т-клетки CD4+ и/или первичные Т-клетки CD4+ яванского макака.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к ВСМА×CD3 также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента. В настоящем изобретении также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E.coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы получения биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента путем культивирования клеток.

В настоящем изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3 или антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель.

Способы применения мультиспецифических антител к ВСМА×CD3.

Кроме того, описаны способы применения мультиспецифических антител к ВСМА×CD3 или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов. Например, мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака, экспрессирующего ВСМА, у нуждающегося в таком лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой лимфому, такую как множественная миелома.

Описанные способы лечения рака, экспрессирующего ВСМА, у нуждающегося в таком лечении субъекта включают введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного мультиспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его мультиспецифического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В предпочтительных вариантах осуществления предлагаются способы лечения субъекта, пораженного раком, путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического антигенсвязывающего фрагмента нуждающемуся в таком лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

Дополнительно в настоящем изобретении предлагаются способы ингибирования роста или пролиферации раковых клеток путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

В настоящем изобретении также предлагаются способы перенаправления Т-клетки к раковой клетке, экспрессирующей ВСМА, путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

Наборы с ВСМА×CD3-специфическим антителом.

В настоящем изобретении описаны наборы, содержащие описанные мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения мультиспецифических антител к ВСМА×CD3, предложенных в настоящем изобретении, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела, описанные в настоящем изобретении, и реагенты, предназначенные для лечения рака, экспрессирующего ВСМА. Соответственно описанные наборы могут включать в себя одно или более мультиспецифических антител или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, и/или инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем изобретении.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Определения.

В настоящем описании и формуле изобретения используются различные термины, относящиеся к аспектам описания. Такие термины должны иметь смысл, который характерен для них в данной области, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем изобретении определениям.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают

и множественные обозначения, если только из содержания текста четко не следует иное. Так, например, обозначение "клетка" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

В контексте настоящего изобретения термин "около" при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и т.п., считается охватывающим отклонения до $\pm 10\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации описанных способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и т.п., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, указанные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

Хотя числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приближенными значениями, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. В настоящем изобретении термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые по существу не содержат других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с ВСМА, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от ВСМА). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом ВСМА, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, от других видов (таких как видовые гомологи ВСМА).

Термин "полинуклеотид", который является синонимом термину "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотидом" называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает в себя ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Значение термина "по существу такой же" может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, как ожидается, можно встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, которые практически не влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые ощутимо не меняют природу кодируемого белка. Соответственно в контексте нуклеотидных последовательностей "по существу такой же" означает

по меньшей мере 65% идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится к по меньшей мере 70% идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99% или более идентичности. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии=кол-во идентичных положений/общее кол-во положений×100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с помощью алгоритма, описанного в публикации E. Meyers, W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм, описанный в публикации Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48, 444-453 (1970).

Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента "по существу такой же" относится к антителу или антигенсвязывающим фрагментам, имеющим 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают в себя ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, основу или другие несвязывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем изобретении, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с последовательностями, описанными в настоящем изобретении.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космида или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

Под термином "клон" понимается популяция клеток, полученная из одной клетки или общего предшественника путем митоза. Под термином "клеточная линия" понимается клон первичной клетки, способный к стабильному росту *in vitro* в течение многих поколений. В некоторых примерах, представленных в настоящем изобретении, клетки трансформируют путем трансфицирования в них ДНК.

Термины "экспрессирует" и "продуцирует" используются в настоящем изобретении как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток.

Термин "лечение" относится к любому успеху или признаку успеха в ослаблении или облегчении симптомов травмы, патологии или состояния, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как ослабление боли, ремиссия, ослабление симптомов или перевод состояния в легче переносимую пациентом форму, замедление скорости развития дегенеративных изменений или угасания функции, перевод конечной точки дегенеративных изменений в менее угнетающую пациента форму, улучшение общего физического или умственного состояния пациента или продление выживаемости. Лечение можно оценивать по объективным или субъективным параметрам, включая результаты объективного обследования, неврологического осмотра или психиатрической экспертизы.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела к ВСМА×CD3 может меняться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела пациента и от способности антитела вызывать желаемый ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

"Антителом" называются все изотипы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая

различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин "антитело" охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

"Антигенсвязывающие фрагменты" представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением, пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают в себя без ограничений диатела и одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature, 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al., Trends Biotechnol., 2003 Nov., 21(11):484-90); антитело верблюжьего типа (камелид) или нанотела (Revets et al., Expert Opin. Biol. Ther., 2005 Jan., 5(1):111-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и т.п. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изотипы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, такие как белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, относящегося к указанной фразе.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностно расположенных групп молекул, таких как аминокислотные или сахарные боковые цепи, а также обычно имеют специфическую трехмерную структуру, а также специфические зарядовые характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что в присутствии денатурирующих растворителей теряется связывание с первыми, но не теряется связывание со вторыми. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, непосредственно не участвующие в связывании, например аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или закрываются пептидом, специфически связывающим антиген (иными словами, аминокислотный остаток находится в пределах зоны, закрытой пептидом, специфически связывающим антиген).

Термины "специфическое связывание", или "иммуноспецифическое связывание", или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и, предпочтительно, отсутствие связывания с другими молекулами в пробе, содержащей смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее около 1×10^{-8} M, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. Такие фразы, как "[антиген]-специфическое" антитело (например, ВСМА-специфическое антитело) означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

В контексте настоящего изобретения термин K_D означает константу равновесия при диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "субъект" означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, например нечеловекообразных приматов, мышей, кроликов, овец, собак, кошек, лошадей, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Во многих вариантах осуществления описанных способов субъект представляет собой человека.

В контексте настоящего изобретения термин "проба" означает набор сходных текучих сред, клеток или тканей (например, хирургически иссеченную ткань опухоли, материал биопсии, включая материал, полученный с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), выделенных у субъекта, а также текучие среды, клетки или ткани, находящиеся внутри тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления проба представляет собой биологическую текучую среду. Биологические текучие среды, как правило, представляют собой жидкости при физиологических температурах и могут включать в себя текучие сре-

ды природного происхождения, находящиеся внутри субъекта или биологического источника, отобранные, экспрессированные или иным образом извлеченные из него. Некоторые биологические текучие среды получены из конкретных тканей, органов или локализованных областей, а некоторые другие биологические текучие среды могут иметь более глобальное или системное расположение в организме субъекта или биологического источника. Примеры биологических текучих сред включают в себя кровь, сыворотку и серозные текучие среды, плазму, лимфу, мочу, слюну, содержимое кисты, слезы, фекалии, мокроту, секрет слизистой секреторных тканей и органов, вагинальные секреты, асцитные текучие среды, например связанные с несолидными опухолями, текучие среды плевральной, перикардиальной, перитонеальной, абдоминальной и других полостей тела, текучие среды, полученные смывом из бронхов, и т.п. Биологические текучие среды также могут включать в себя жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например среду для культивирования клеток или органов, в том числе среду, кондиционированную клетками или органами, промывные текучие среды и т.п. В контексте настоящего изобретения термин "проба" охватывает материалы, извлеченные из организма субъекта, или материалы, находящиеся в организме субъекта.

"Известный стандарт" может представлять собой раствор, включающий в себя известное количество или концентрацию ВСМА, где раствор может представлять собой раствор природного происхождения, например пробу от пациента, имеющего по известным данным раннюю, среднюю или позднюю стадию рака, прогрессирующий или стабильный рак, или раствор может представлять собой синтетический раствор, например водный буфер, содержащий известное количество разведенного в нем ВСМА. Известные стандарты, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя ВСМА, выделенный из организма субъекта, а также рекомбинантный или очищенный белок ВСМА или значение концентрации ВСМА, связанной с состоянием заболевания.

Термин "ВСМА" в настоящем изобретении относится к человеческому антигену созревания В-клеток, также называемому ВСМА, CD269 и TNFRSF17 (UniProt Q02223), который является членом надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, предпочтительно экспрессируемых в дифференцированных плазмочитах. Внеклеточный домен ВСМА человека в соответствии с UniProt состоит из аминокислот 1-54 (или 5-51). Термин "антитело к ВСМА" в настоящем изобретении относится к антителу, которое иммуноспецифически связывается с ВСМА.

Термин CD3 относится к человеческому белковому комплексу CD3, состоящему из множества субъединиц. Состоящий из множества субъединиц белковый комплекс CD3 состоит из 6 отдельных полипептидных цепей. Сюда входят цепь CD3 γ (номер доступа в базе данных SwissProt P09693), цепь CD35 (SwissProt P04234), две цепи CD3 ϵ (SwissProt P07766) и один гомодимер цепи CD3 ζ (SwissProt 20963), причем комплекс связан с цепями α и β Т-клеточного рецептора. Термин CD3 при отсутствии особых указаний включает в себя любой вариант, изоформу и видовой гомолог CD3, который в природе экспрессируется клетками (включая Т-клетки) или который может экспрессироваться на клетках, трансфицированных генами или кДНК, кодирующей эти полипептиды.

"Антитело к ВСМА \times CD3" представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно биспецифическое антитело, которое содержит две разные антигенсвязывающиеся области, одна из которых специфически связывается с антигеном ВСМА, а другая специфически связывается с CD3.

Мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое антитело, диатело или сходную молекулу (см., например, публикацию PNAS, USA, 90(14), 6444-8 (1993), в которой приведено описание диател). Биспецифические молекулы, диатела и т.п., предложенные в настоящем изобретении, помимо части ВСМА могут связываться с любой приемлемой мишенью. Термин "биспецифическое антитело" следует понимать как антитело, имеющее две разные антигенсвязывающие области, определяемые разными последовательностями антитела. Это можно понимать как связывание с разными мишенями, но также сюда входит связывание с разными эпитопами на одной мишени.

"Эталонная проба" представляет собой пробу, которую можно сравнить с другой пробой, такой как исследуемая проба, для составления характеристики сравниваемой пробы. Эталонная проба будет иметь какое-либо охарактеризованное свойство, которое служит основой для сравнения с исследуемой пробой. Например, эталонную пробу можно использовать как опорное значение концентраций ВСМА, которые служат показателем наличия рака у субъекта. Эталонную пробу не обязательно следует анализировать параллельно с исследуемой пробой, следовательно, в некоторых случаях эталонная проба может представлять собой ранее определенное числовое значение или диапазон, характеризующий данное состояние, например уровни ВСМА, которые служат показателями наличия рака у субъекта. Термин также включает в себя пробы, используемые для сравнительных целей и которые по имеющимся данным связаны с физиологическим состоянием или состоянием заболевания, например раком, экспрессирующим ВСМА, но имеющие неизвестное количество ВСМА.

Термин "прогрессирование" в контексте прогрессирования рака, экспрессирующего ВСМА, включает в себя изменение состояния рака от менее тяжелого к более тяжелому. Прогрессирование может включать в себя увеличение количества или тяжести опухолей, степени метастазирования, скорости, с которой рак растет или распространяется, и т.п. Например, "прогрессирование рака толстой кишки"

включает в себя прогрессирование такого рака из менее тяжелого в более тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии I до стадии II, от стадии II до стадии III и т.п.

Термин "обратное развитие" в контексте обратного развития рака, экспрессирующего ВСМА, включает в себя изменение состояния рака от более тяжелого к менее тяжелому. Обратное развитие может включать в себя снижение количества или тяжести опухолей, степени метастазирования, скорости, с которой рак растет или распространяется, и т.п. Например, "обратное развитие рака толстой кишки" включает в себя обратное развитие такого рака из более тяжелого в менее тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии III до стадии II, от стадии II до стадии I и т.п.

Термин "стабильный" в контексте стабильного рака, экспрессирующего ВСМА, описывает состояние заболевания, которое существенно не изменяется или не изменилось в течение клинически значимого периода времени, чтобы его можно было считать прогрессирующим или раком с обратным развитием.

Варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, не ограничиваются конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться.

ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем изобретении описаны рекомбинантные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с ВСМА. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

К описанным ВСМА-специфическим антителам или антигенсвязывающим фрагментам относятся все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулинов. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, по существу обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида посредством рекомбинантных способов. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козы, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученных не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. В настоящем изобретении термин "химерный" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного варибельного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 1.

В настоящем изобретении описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в настоящем изобретении в качестве примера, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается ВСМА-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается ВСМА-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2

SEQ ID NO. 74

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc (SEQ ID NO. 73).

SEQ ID NO. 73

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDCVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNH YTKSLSLSLGK

Специфические антитела, определяющиеся последовательностями CDR и/или вариабельных доменов, как описано в абзацах выше, могут включать в себя эти области Fc IgG.

Кроме того, описаны выделенные синтетические полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с ВСМА. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты вариабельных доменов, предлагаемые в настоящем изобретении, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие обозначения:

i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и

ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка.

Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя

(a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами;

(b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него;

(c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель; и

(d) варианты, в которых полипептид сливаются с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

BCMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1 или IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

BCMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, по отношению к связыванию с APRIL имеют значения IC_{50} по меньшей мере 5,9 нМ. IC_{50} описанных BCMA-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов могут быть определены множеством способов, известных в данной области, таких как способы, основанные на твердофазном ИФА, или проточная цитометрия (FACS). В анализах, в которых IC_{50} измеряется посредством твердофазного ИФА, используются связанный с планшетом BCMA в присутствии или при отсутствии BCMA-специфического антитела и различные концентрации APRIL. Антитело к BCMA, которое блокирует связывание APRIL с BCMA, называется "блокирующим APRIL при измерении посредством твердофазного ИФА".

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем изобретении. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фэгмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролируемые терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol., 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность BCMA-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например промотора металлотioneина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), как промоторы протеинкиназы R 2',5'-олигоденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т.п.

Векторы, описанные в настоящем изобретении, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т.е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя, например, маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину, ген резистентности к пурамицину, ген резистентности к бластицидину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пурииннуклеозид-фосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther., 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем изобретении, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, в другом аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ВСМА, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примерами в настоящем изобретении.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем изобретении. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т.п. (описано в публикации Cline, 29 Pharmac. Ther., 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, приемлемым для применения в экспрессии ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO-K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и т.п. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем изобретении, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Способы применения ВСМА-специфических антител для лечения В настоящем изобретении предлагаются ВСМА-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для применения в терапии. В частности, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно применять при лече-

нии рака, например рака, экспрессирующего ВСМА. Соответственно в изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение антитела, описанного в настоящем изобретении, например ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Например, применение может осуществляться путем блокировки взаимодействий рецептора ВСМА или там, где антитело конъюгируют с токсином, таким образом, направляя токсин к раку, экспрессирующему ВСМА. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя лимфому, такую как множественная миелома (ММ). Антитела для применения в этих способах включают антитела, описанные выше в настоящем изобретении, такие как ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент со свойствами, описанными в табл. 1, например с последовательностями CDR или вариабельных доменов, которые также представлены в дальнейшем описании этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, иммуноэффекторное свойство ВСМА-специфических антител могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области.

Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки, BCR) и т.п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность", или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные (ЕК) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc.гамма.RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology*, 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO LecI3 (Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MABs*, 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение крысиной гибридомной клеточной линии YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.*, 278:3466-3473, 2003), введение малых интерферирующих РНК, особенно к гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 88:901-908, 2004), или коэкспрессия бета-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и альфа-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J. Biol. Chem.*, 281:5032-5036, 2006; Ferrara et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, ADCC, вызванную антителами к ВСМА, также можно усилить путем введения некоторых замен в область Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6737056.

Способы обнаружения ВСМА.

В настоящем изобретении предлагаются способы обнаружения ВСМА в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в настоящем изобретении. Как описано в настоящем изобретении, пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают обнаружение ВСМА в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с любым из ВСМА-специфических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с более чем одним из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении. Например, пробу можно приводить в контакт с первым ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем приводить в контакт со вторым ВСМА-специфическим анти-

телом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например поверхности многолуночного планшета, чипа, либо к сходному субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ни к чему не прикреплены, или не зафиксированы.

Описанные ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение ВСМА посредством способов, описанных в настоящем изобретении. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т.п.

Описанные ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения ВСМА в биологической пробе. Некоторые приемлемые анализы включают без ограничений вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, обнаружение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА, у субъекта можно использовать для определения того, можно ли лечить субъекта терапевтическим агентом, направленным против ВСМА.

ВСМА присутствует в определенных концентрациях в пробах крови и сыворотки. Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются способы обнаружения ВСМА в пробе, полученной из крови, например пробе сыворотки, путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с ВСМА. Пробу крови или ее производное можно разводить, фракционировать или иным способом обрабатывать для получения пробы, на которой можно осуществить описанный способ. В некоторых вариантах осуществления ВСМА можно обнаруживать в пробе крови или в ее производном при помощи любого количества анализов, известных специалистам в данной области, например без ограничений таких, как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

Способы диагностики рака.

В настоящем изобретении предлагаются способы диагностики рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше, обнаружение ВСМА в биологической пробе, например, в пробе крови или сыворотки, обеспечивает возможность диагностики рака у субъекта, от которого была получена проба. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления для оценки того, имеется ли рак у субъекта, от которого была получена проба, можно использовать другие пробы, например гистологическую пробу, пробу, полученную с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии, хирургически иссеченную ткань опухоли, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки и т.п. В некоторых вариантах осуществления уже может быть известно, что субъект, от которого получена проба, имеет рак, но тип рака у субъекта может быть еще не диагностированным, или предварительный диагноз может быть неточным, и, следовательно, обнаружение ВСМА в биологической пробе, полученной от субъекта, может позволить поставить или уточнить диагноз рака. Например, может быть известно, что у субъекта имеется рак, но может быть неизвестно или неочевидно, является ли он раком, экспрессирующим ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим ВСМА, путем определения количества ВСМА, присутствующего в биологической пробе, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе,

причем разница между количеством ВСМА в пробе, полученной от субъекта, и количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе служит указанием на то, что субъект поражен раком, экспрессирующим ВСМА.

В другом варианте осуществления количество ВСМА, наблюдаемое в биологической пробе, полу-

ченной от субъекта, можно сравнить с уровнями ВСМА, которые, по имеющимся данным, ассоциированы с определенными формами или стадиями рака, с целью определения формы или стадии рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в пробе, полученной от субъекта, оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые иммуноспецифически связываются с ВСМА, например, с ВСМА-специфическими антителами, описанными в настоящем изобретении. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя гемобластоз, такой как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способ диагностики рака, экспрессирующего ВСМА, будет включать приведение биологической пробы субъекта в контакт с ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), определение количества ВСМА, присутствующего в пробе, при связывании с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с известной стандартной или эталонной пробой и определение того, попадают ли уровни ВСМА субъекта в пределы уровней ВСМА, связанных с раком. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия введения или назначения специфического противоракового лечения. В другом варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия передачи результатов определения для облегчения лечения рака. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против типов рака, экспрессирующего ВСМА, например мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3, описанные в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим ВСМА, путем определения количества ВСМА, присутствующего в пробе крови или сыворотки, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе, причем разница между количеством ВСМА в пробе, полученной от субъекта, и количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе служит указанием на то, что субъект поражен раком, экспрессирующим ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления контрольную или эталонную пробу можно получить от субъекта, не пораженного раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления контрольную или эталонную пробу можно получить от субъекта, пораженного раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, не пораженного раком, экспрессирующим ВСМА, наблюдаемое увеличение количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект поражен раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная проба получена от субъекта, не пораженного раком, экспрессирующим ВСМА, наблюдаемое уменьшение или сходство количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект не поражен раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, пораженного раком, экспрессирующим ВСМА, наблюдаемое сходство количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект поражен раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, пораженного раком, экспрессирующим ВСМА, наблюдаемое уменьшение количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект не поражен раком, экспрессирующим ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в пробе, полученной от субъекта, оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с ВСМА, например с антителами, описанными в настоящем изобретении. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из пробы крови, пробы сыворотки, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

В различных аспектах количество ВСМА определяют путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, специфически связывающихся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с ВСМА, а затем приводить в контакт со вторым антителом

или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с ВСМА. В этом качестве можно использовать ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, такие как описанные в настоящем изобретении.

Для осуществления описанных способов диагностики в качестве "первого" и "второго" антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации ВСМА-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ).

В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА определяют таким методом, как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

В различных вариантах осуществления описанных способов диагностики используют контрольную или эталонную пробу. Эта проба может представлять собой положительный или отрицательный аналитический контроль, гарантирующий, что анализ работает должным образом; например, аналитический контроль такого рода можно обычно использовать для иммуногистохимических анализов. Альтернативно проба может представлять собой стандартизованный эталон количества ВСМА в биологической пробе от здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровни ВСМА, наблюдаемые у исследуемого субъекта, можно сравнивать с уровнями ВСМА, наблюдаемыми в пробах от субъектов с известным диагнозом рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых вариантах осуществления контрольный субъект может быть поражен конкретным интересующим видом рака. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет раннюю стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет промежуточную стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет позднюю стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА.

Способы контроля рака.

В настоящем изобретении предлагаются способы контроля рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, прогрессирует, показывает обратное развитие или остается стабильным рак, экспрессирующий ВСМА, путем

определения количества ВСМА, присутствующего в исследуемой пробе, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в биологической пробе, полученной сходным образом у субъекта в более ранний момент времени,

причем различие между количеством ВСМА в исследуемой пробе и ранее полученной пробе служит показателем того, является ли рак прогрессирующим, показывающим обратное развитие или стабильным.

В этом отношении увеличенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на прогрессирование рака, экспрессирующего ВСМА. Напротив, уменьшенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на обратное развитие рака, экспрессирующего ВСМА.

Соответственно незначительное различие количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на стабильное течение рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в биологической пробе, полученной от субъекта, оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или фрагментом антитела, специфически связывающимся с ВСМА, например с антителами, описанными в настоящем изобретении. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля рака, экспрессирующего ВСМА, будут включать приведение биологической пробы от субъекта в контакт с ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), количественную оценку ВСМА, присутствующего в пробе, сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с количеством ВСМА, определенном в биологической пробе, полученной сходным образом от того же субъекта в более ранний момент времени; и определение того, изменился ли уровень ВСМА у субъекта со временем. Увеличенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с количеством в ранее полученной пробе может указывать на прогрессирование рака. Напротив, уменьшенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на обратное развитие рака, экспрессирующего ВСМА. Соответственно несущест-

венное различие количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на стабильное течение рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых вариантах осуществления уровни ВСМА в пробе можно сравнивать с известным стандартом или эталонной пробой отдельно или в качестве дополнения к сравнению с уровнями ВСМА, которые наблюдали в пробе в более ранний момент времени. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия назначения специфического противоракового лечения. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против типов рака, экспрессирующего ВСМА, например мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3, описанные в настоящем изобретении.

В различных аспектах количество ВСМА определяют путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, специфически связывающихся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с ВСМА, а затем приводить в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с ВСМА. В этом качестве можно использовать антитела, такие как описанные в настоящем изобретении.

Для осуществления описанных способов контроля в качестве "первого" и "второго" антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации антител и антигенсвязывающих фрагментов, как описано в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя гемобластоз, такой как острый миелоидный лейкоз (AML).

В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА определяют таким методом, как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

Наборы для обнаружения ВСМА.

В настоящем изобретении предлагаются наборы для обнаружения ВСМА в биологической пробе. Эти наборы включают в себя одно или более ВСМА-специфических антител, описанных в настоящем изобретении, или их антигенсвязывающий фрагмент и инструкции по применению набора.

Предлагаемое ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут находиться в растворе; быть лиофилизированными; прикрепленными к субстрату, носителю или планшету; или могут быть мечеными с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем изобретении. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения пробы от субъекта, контрольной или эталонной пробы, например пробы от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта без рака, одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня ВСМА могут, например, дополнительно включать в себя буферные растворы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня ВСМА. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии ВСМА.

Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения пробы от субъекта. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от субъекта. Средства для получения пробы от субъекта также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из пробы крови. Предпочтительно набор предназначен для применения у человеческого индивида.

Мультиспецифические антитела.

Связывающие домены антител к ВСМА, описанные в настоящем изобретении, распознают клетки, экспрессирующие ВСМА на своей поверхности. Как отмечалось выше, экспрессия ВСМА может быть показателем раковой клетки. Более специфического нацеливания на конкретные субпопуляции клеток можно добиться путем получения биспецифических молекул, таких как антитела или фрагменты антител, которые связываются с ВСМА и с другой мишенью, такой как CD3. Это достигается путем получения молекулы, которая содержит первую область, связывающуюся с ВСМА, и вторую область, связывающуюся с другим антигеном-мишенью. Антигенсвязывающие области способны принимать любую форму, которая обеспечивает специфическое распознавание мишени, например, область связывания может представлять собой или может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, Fv (комбинацию переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи), домен связывания, основанный на домене фибронектина типа III (таком как домен фибронектина, или домен, основанный на кон-

сенсусной последовательности доменов фибронектина типа III, или домен тенасцина, или домен, основанный на консенсусной последовательности доменов тенасцина типа III, например, молекулы центрина от компании Janssen Biotech, Inc.; см., например, WO 2010/051274 и WO 2010/093627). Соответственно предлагаются биспецифические молекулы, содержащие две разные антигенсвязывающие области, которые связываются с ВСМА и другим антигеном соответственно.

Некоторые мультиспецифические антитела, описанные в настоящем изобретении, содержат две разные антигенсвязывающие области, которые связываются с ВСМА и CD3 соответственно. В предпочтительном варианте осуществления предлагаются мультиспецифические антитела, связывающиеся с ВСМА и CD3 (мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3), и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с ВСМА, и вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 представляет собой биспецифическое антитело, содержащее ВСМА-специфическое плечо, которое содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3, и CD3-специфическое плечо, которое содержит вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела изобретения включают в себя антитела, имеющие структуру полноразмерного антитела. В настоящем изобретении термин "полноразмерное антитело" означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Тяжелая цепь (HC) полноразмерного антитела включает в себя переменные и константные домены VH, CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи. Легкая цепь (LC) полноразмерного антитела включает в себя переменные и константные домены VL и CL легкой цепи. Полноразмерное антитело может не содержать С-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях. Термин

"Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, которая специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления один из антигенсвязывающих доменов представляет собой основанный не на антителе домен связывания, например домен связывания, основанный на домене фибронектина типа 3, например центрин.

ВСМА-связывающее плечо мультиспецифических антител, предложенных в настоящем изобретении, может быть получено из любого из описанных выше ВСМА-специфических антител. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, полученные из клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, полученные из клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, полученные из клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, полученные из клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи клона ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи клона антитела, как описано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи клона ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177. В некоторых примерах осуществления таких ВСМА-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи клона ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177.

В табл. 3 приведен перечень биспецифических антител к ВСМА×CD3, имеющих одну пару тяжелой и легкой цепей, специфическую к ВСМА, и другую пару тяжелой и легкой цепей, специфическую к CD3, где идентификатор конкретного антитела приведен для описания антиген-специфических плеч антитела, используемых для обеспечения описанного варианта осуществления.

Таблица 3

BCMA-специфическое плечо=идентификатор Ab	CD3-специфическое плечо=идентификатор Ab
BCMB69	CD3B219
BCMB117	CD3B219
BCMB123	CD3B219
BCMB128	CD3B219
BCMB129	CD3B219
BCMB176	CD3B219
BCMB177	CD3B219

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител BCMA-связывающее плечо также связывается с BCMA яванского макака, предпочтительно с его внеклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо мультиспецифического антитела представляет собой IgG или его производное, например, изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых BCMA-связывающее плечо имеет изотип IgG4, оно содержит замену(ы) S228P, L234A и L235A в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител второе антигенсвязывающее плечо связывается с CD3 человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления CD3-специфическое плечо биспецифического антитела к BCMA×CD3 получено из CD3-специфического антитела, которое связывает и активирует первичные Т-клетки человека и/или первичные Т-клетки яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с эпитопом на N-конце CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо контактирует с эпитопом, включающим в себя шесть N-концевых аминокислот CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое связывающее плечо биспецифического антитела получено из мышиноного моноклонального антитела SP34, мышиноного изотипа IgG3/лямбда. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR антитела SP34. Такие CD3-связывающие плечи могут связываться с CD3 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее. CD3-специфическое связывающее плечо может представлять собой гуманизированный вариант плеча мышиноного моноклонального антитела SP34. Для гуманизации антитела к CD3, из которого получают CD3-специфическое плечо, можно использовать адаптацию для человеческого каркаса (HFA). В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD3-связывающее плечо содержит пару из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из табл. 2. В других вариантах осуществления биспецифических антител CD3-связывающее плечо содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в табл. 2. Например, последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи некоторых вариантов осуществления CD3-связывающего плеча биспецифических антител, которые описаны в настоящем изобретении, могут включать в себя следующие аминокислотные последовательности: Hc CDR1, SEQ ID NO: 59; Hc CDR2: SEQ ID NO: 60; Hc CDR3, SEQ ID NO: 61; Lc CDR1, SEQ ID NO: 62; Lc CDR2: SEQ ID NO: 63; и Lc CDR3, SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD3-связывающее плечо имеет изотип IgG4, оно содержит замену(ы) S228P, L234A, L235A, F405L и R409K в области Fc. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных человеческих Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные человеческие Т-клетки CD4+. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные Т-клетки CD4+ яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к BCMA×CD3, имеющее BCMA-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь клона BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 или BCMB177 антитела. В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к BCMA×CD3, имеющее BCMA-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь клона BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 или BCMB177 антитела. В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к BCMA×CD3, имеющее CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь клона CD3B219 антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, имеющее CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь клона CD3B219 антитела. В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, имеющее ВСМА-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь клона ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177 антитела, и CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь клона CD3B219 антитела. В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, имеющее ВСМА-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь клона ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177 антитела, и CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь клона CD3B219 антитела.

Пример биспецифического антитела к ВСМА×CD3 приведен в табл. 9.

Были описаны разные форматы биспецифических антител, и обзор по ним недавно был представлен в публикации Chames and Baty (2009), *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, 12:276.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения представляет собой диатело, кросстело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами, например описанными в настоящем изобретении способами.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ для усиления гетеродимеризации; рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, причем каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента;

слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями;

слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом;

антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ включают в себя молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotechthe), "выступы во впадины" (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Amgen), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное тело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody® (Genmab A/S).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания включают в себя молекулы (DT)-Ig двойного нацеливания (GSK/Domantis), антитело "два в одном" (Genentech), поперечношитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-body (CovX/Pfizer).

В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают в себя молекулы (DVD)-Ig с двойным переменным доменом (DVD) (Abbott), IgG-подобную биспецифическую молекулу (Inn-Clone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

В некоторых вариантах осуществления слитые Fc-молекулы включают в себя слияния ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), "двойного действия" или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический T-клеточный активатор (BITE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние ScFv человеческого сывороточного альбумина (Merimack) и COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

Полноразмерные биспецифические антитела изобретения можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител обра-

зуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно сконструировать так, чтобы они способствовали гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на ВСМА и эпитопом на CD3.

В настоящем изобретении термин "гомодимеризация" обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем изобретении термин "гомодимер" обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В настоящем изобретении термин "гетеродимеризация" обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем изобретении термин "гетеродимер" обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергнуть мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, стимулируя образование гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532; В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F_Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в СНЗ-областях двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к ВСМА) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD3) конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи; таким образом, образуется биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально вернуть к невозстановительным условиям. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиозеитритол (ДТЕ), глутатион, трис (2-карбоксиил) фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис (2-карбоксиил) фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к ВСМА×CD3 также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3. В настоящем изобретении также предлагаются векторы, содержащие описанные поли-

нуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E.coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридными клетками.

Терапевтическая композиция и способы лечения с применением мультиспецифических антител и их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов.

Описанные выше биспецифические антитела к ВСМА, такие как описанные выше биспецифические антитела к ВСМА×CD3, полезны в терапии. В частности, биспецифические антитела к ВСМА полезны при лечении рака. В настоящем изобретении также предлагаются терапевтические композиции для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих, содержащие терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или мультиспецифического антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака, экспрессирующего ВСМА, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака, экспрессирующие ВСМА, такие как множественная миелома (ММ); и другие виды рака, которые пока не определены как экспрессирующие ВСМА. Конкретные биспецифические антитела, полезные для лечения рака, например гемобластоза, включая описанные выше конкретные виды рака, включают в себя антитела ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177, или CD3В219. Одним примером биспецифического антитела, которое можно применять для лечения рака, например гемобластоза, включая эти конкретные виды рака, является антитело ВСМВ72.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат

- a) эффективное количество мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения; и
- b) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным.

В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемые носители" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры приемлемых носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают в себя одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также любую их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры приемлемого носителя включают в себя

- (1) фосфатно-солевой буферный раствор по Дульбекко, рН около 7,4, содержащий или не содержащий от около 1 до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина;
- (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия (NaCl)); и
- (3) 5% (мас./об.) декстрозу; и

он также может содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Твин 20®.

Композиции, описанные в настоящем изобретении, также могут содержать дополнительный терапевтический агент, являющийся необходимым для конкретного подлежащего лечению расстройства. Предпочтительно, чтобы мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела и дополнительное активное соединение имели комплементарные виды активности, которые не влияют друг на друга отрицательным образом. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Композиции изобретения могут быть представлены в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, но предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и от терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов, пригодных для инъекции или инфузии. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интрапери-

тонеальный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления выполняют внутривенное болюсное введение композиций изобретения, либо их вводят в виде непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их вводят внутримышечно, подкожно, внутрисуставно, внутрь опухоли, около опухоли, в пораженную ткань или около пораженной ткани, чтобы они оказывали локальный и системный терапевтические эффекты.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать путем введения антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела настоящего изобретения в нужном количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. В качестве растворителя или носителя можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, в частности, смачивающие, изотонизирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерильные композиции для парентерального введения также можно получать в виде стерильных твердых композиций, растворяемых во время применения в стерильной воде или любой другой пригодной для инъекций стерильной среде.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела также можно вводить перорально. В качестве твердых композиций для перорального применения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, пакеты-саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент в соответствии с изобретением в потоке аргона смешивают с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или диоксид кремния. Эти композиции также могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, краситель, покрытие (таблетка с сахарным покрытием) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например смачивающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и применяемого способа введения; они по существу составляют от 5 до 1000 мг в сутки перорально для взрослых, при разовых дозах в диапазоне от 1 до 250 мг активного вещества. В целом соответствующую дозировку определяет врач в зависимости от возраста, массы тела и других факторов, специфичных для подлежащего лечению субъекта.

В настоящем изобретении также предлагаются способы уничтожения клеток, экспрессирующих ВСМА, путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту мультиспецифического антитела, которое связывается с указанной клеткой, экспрессирующей ВСМА, и способно рекрутировать Т-клетки для уничтожения указанной клетки, экспрессирующей ВСМА (т.е. перенаправление Т-клеток). В терапевтических целях можно использовать любые из мультиспецифических антител или фрагментов антител изобретения. Например, в одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3 ВСМВ72 можно использовать с терапевтической целью для лечения рака у субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифические антитела или фрагменты антител изобретения применяют для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих. В более предпочтительном варианте осуществления для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих применяют одну из вышеописанных фармацевтических композиций, содержащих мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела изобретения. В одном варианте осуществления расстройство представляет собой рак. В частности, рак представляет собой рак, экспрессирующий ВСМА, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака, экспрессирующие ВСМА, такие как множественная миелома (ММ); и другие виды рака, которые пока не определены как экспрессирующие ВСМА. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно фармацевтические композиции изобретения могут применяться для лечения или предотвращения различных видов рака, включая (без ограничений) следующие: рак, экспрессирующий ВСМА, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака, экспрессирующие ВСМА, такие как острая множественная миелома (ММ); и другие виды рака, которые пока не определены как экспрессирующие ВСМА.

Аналогично в настоящем изобретении дополнительно предлагается способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий приведение экспрессирующих ВСМА клеток-мишеней или ткани, содержащей такие клетки-мишени, в контакт с эффективным количеством мультиспецифического

антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими цитотоксическими или терапевтическими агентами, в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Способ ингибирования роста выбранных популяций клеток можно использовать на практике *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Примеры применения *in vitro* включают

обработку аутогенного костного мозга перед его трансплантацией тому же пациенту с целью уничтожения пораженных или злокачественных клеток;

обработку костного мозга перед его трансплантацией с целью уничтожения компетентных Т-клеток и предотвращения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD);

обработку клеточных культур с целью уничтожения всех клеток за исключением нужных вариантов, которые не экспрессируют антиген-мишень; или с целью уничтожения вариантов, экспрессирующих нежелательный антиген.

Условия неклинического применения *in vitro* может легко определить специалист в данной области.

Примером клинического применения *ex vivo* является удаление опухолевых клеток из костного мозга перед аутотрансплантацией при лечении рака. Лечение можно проводить описанным ниже образом. Костный мозг берут у пациента или другого субъекта, а впоследствии инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавлен цитотоксический агент изобретения. Концентрации варьируются от около 10 до 1 мкМ в течение от около 30 мин до около 48 ч при температуре около 37°C. Точные значения концентрации и времени инкубации, т.е. дозы, могут быть легко определены специалистом в данной области. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту путем в/в инфузии в соответствии с известными способами. В тех случаях, в которых между моментом отбора костного мозга и обратного введения обработанных клеток пациент получает другие виды лечения, например курс абляционной химиотерапии или облучения всего тела, обработанные клетки костного мозга хранят замороженными в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

При клиническом применении *in vivo* терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента вводят нуждающемуся в таком лечении субъекту. Например, мультиспецифические антитела к ВСМА×CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака, экспрессирующего ВСМА, у нуждающегося в таком лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий ВСМА, включает в себя В-клеточный рак, такой как множественная миелома (ММ). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде раствора, протестированного на стерильность.

Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить по показаниям терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут готовить в виде стандартных единиц дозирования для упрощения введения и унификации дозирования.

Эффективные дозировки и схемы дозирования мультиспецифических антител и фрагментов зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и могут быть определены специалистом в данной области. Не имеющим ограничительного характера примером диапазона терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения является диапазон около 0,001-10 мг/кг, например около 0,001-5 мг/кг, например около 0,001-2 мг/кг, например около 0,001-1 мг/кг, например около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с более низких доз мультиспецифического антитела или фрагмента, входящих в фармацевтическую композицию, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического эффекта, и

постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. В целом приемлемой суточной дозой биспецифического антитела настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозы, например, можно рассчитать на основании доз в мг/кг, описанных выше, согласно следующей формуле: доза (мг/кг)×70:1,8. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например от 3 до 5 раз. Введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного времени, например более 24 ч, чтобы уменьшить побочные токсические эффекты.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в еженедельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, вводимая до восьми раз, например от четырех до шести раз, один раз в неделю. Такую схему можно повторять один или более раз по мере необходимости, например, через шесть месяцев или двенадцать месяцев. Такие фиксированные дозы, например, могут быть основаны на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 70 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество биспецифического антитела настоящего изобретения в крови после введения, например, путем получения биологической пробы и использования антиидиотипических антител, нацеленных на ВСМА-связывающую область мультиспецифических антител настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода в шесть или более месяцев.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака.

Мультиспецифические антитела и их фрагменты, описанные в настоящем изобретении, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно в одном варианте осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления другой терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным, в любом порядке. При одновременном введении агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, в зависимости от ситуации.

В одном варианте осуществления предлагается способ лечения расстройства у субъекта с вовлечением клеток, экспрессирующих ВСМА, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например биспецифического антитела к ВСМА×CD3, описанного в настоящем изобретении, и проведение лучевой терапии. В одном варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения рака, причем способ включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например антитела к ВСМА×CD3, описанного в настоящем изобретении, и проведение лучевой терапии. Предлагается лучевая терапия, которая может включать облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечению пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иод-123, иод-131 и индий-111.

Наборы.

В настоящем изобретении также предлагаются наборы, например, содержащие описанное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и инструкции по применению антитела или фрагмента для уничтожения определенных типов клеток. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. Инструкции могут включать в себя указания по применению мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Как правило, набор имеет отделение, содержащее мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть представлены в лиофилизированном виде, жидком виде или другом виде, пригодном для включе-

ния в набор. Набор также может содержать дополнительные элементы, необходимые для практического применения описанного способа согласно инструкциям к набору, например, стерилизованный раствор для разведения лиофилизированного порошка, дополнительные агенты для комбинирования с мультиспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом перед введением пациенту, и инструменты, способствующие введению мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту.

Диагностические виды применения.

Мультиспецифические антитела и фрагменты, описанные в настоящем изобретении, также можно применять для диагностических целей. Следовательно, также предлагаются диагностические композиции, содержащие мультиспецифическое антитело или фрагменты, описанные в настоящем изобретении, и их применение. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, как описано в настоящем изобретении, или его биспецифический к ВСМА×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается набор для диагностики рака, содержащий контейнер, который содержит биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 и один или более реагентов для обнаружения связывания антитела с ВСМА. Реагенты могут включать в себя, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие обнаруживаемые метки. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем в результате ферментативных реакций образуется продукт, который можно визуализировать. Например, мультиспецифические антитела, описанные в настоящем изобретении, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпителиальной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТРА), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и бета-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными в данной области.

Примеры осуществления описанного объекта изобретения

Для лучшего и более полного описания объекта изобретения в данном разделе в виде нумерованного списка приведены примеры осуществления представленного объекта изобретения.

Ниже представлены варианты осуществления в виде нумерованного списка.

1. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который иммуноспецифически связывается с ВСМА, причем антитело имеет тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит

а) определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

б) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

в) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

г) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

д) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

е) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

ж) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем указанное антитело дополнительно содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, в котором тяжелая цепь антитела (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; тяжелая цепь антитела (б) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57;

тяжелая цепь антитела (f) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;
 тяжелая цепь антитела (k) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;
 тяжелая цепь антитела (l) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;
 тяжелая цепь антитела (m) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или
 тяжелая цепь антитела (n) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2 или варианту осуществления 3, в котором легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-4, которые связываются с внеклеточным доменом ВСМА человека.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, которые представляют собой человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

7. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-6, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент или одноцепочечное антитело.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, которые ингибируют взаимодействие ВСМА и APRIL.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 8, которые показывают IC₅₀ для взаимодействия ВСМА и APRIL - около 5,9 нМ при измерении посредством твердофазного ИФА.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, которые представляют собой IgG.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10 имеют изотип IgG4.

12. Антитело по варианту осуществления 11, в котором IgG4 имеет замену S228P, замену L234A и замену L235A в области Fc.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-12, которые иммуноспецифически связываются с ВСМА человека и вступают в перекрестную реакцию с ВСМА яванского макака.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-13, которые связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой миеломы.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, которые связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

16. Рекомбинантная клетка, экспрессирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-15.

17. Клетка по варианту осуществления 16, которая представляет собой гибридому.

18. Клетка по варианту осуществления 16, в которой антитело получено рекомбинантным способом.

19. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3, содержащие

a) первую тяжелую цепь (HC1);

b) вторую тяжелую цепь (HC2);

c) первую легкую цепь (LC1); и

d) вторую легкую цепь (LC2),

причем HC1 связана с LC1, а HC2 связана с LC2, и

при этом HC1 содержит SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, а LC1 содержит SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 с образованием первого антигенсвязывающего сайта, который иммуноспецифически связывается с CD3, и

при этом HC2 содержит SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, а LC2 содержит SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 с образованием второго антигенсвязывающего сайта, который иммуноспецифически связывается с ВСМА.

20. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его фрагмент по варианту осуществления 19, содержащие HC1, содержащую SEQ ID NO: 55, LC1, содержащую SEQ ID NO: 56, HC2, содержащую SEQ ID NO: 65, и LC2, содержащую a) SEQ ID NO: 66 или b) SEQ ID NO: 76.

21. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 20, которые представляют собой IgG.

22. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому из варианта осуществления 19, варианта осуществления 20 или варианта осуществления 21, которые имеют изотип IgG4.

23. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 19-22, которые иммуноспецифически связываются с ВСМА человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере 0,22 нМ по данным измерения методом поверхностного плазмонного резонанса.

24. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 19-23, которые связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой миеломы.

25. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 19-24, которые связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

26. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 19-25, которые индуцируют активацию человеческой Т-клетки *in vitro* при EC₅₀ менее около 0,37 нМ.

27. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 19-26, которые индуцируют зависимую от Т-клеток цитотоксичность ВСМА-экспрессирующих клеток *in vitro* при EC₅₀ менее около 0,45 нМ.

28. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 19-27, которые не являются агонистами ВСМА.

29. Биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 19-28, которые не влияют на активацию NF-κB при концентрациях ниже 10 нМ.

30. Рекомбинантная клетка, экспрессирующая антитело или биспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 19-29.

31. Клетка по варианту осуществления 30, которая представляет собой гибридому.

32. Способ лечения субъекта, пораженного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 19-29 нуждающемуся в таком лечении субъекту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

33. Способ ингибирования роста или пролиферации раковых клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 19-29 для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

34. Способ перенаправления Т-клетки к экспрессирующей ВСМА раковой клетке, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 19-29 для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

35. Способ по варианту осуществления 32, 33 или 34, в котором рак представляет собой гемобластоз.

36. Способ по варианту осуществления 35, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак, экспрессирующий ВСМА.

37. Способ по варианту осуществления 36, в котором В-клеточная раковая опухоль, экспрессирующая ВСМА, представляет собой множественную миелому.

38. Способ по варианту осуществления 32, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

39. Способ по варианту осуществления 38, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.

40. Способ по варианту осуществления 39, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 19-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

42. Способ получения биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 19-29 путем культивирования клетки по любому из вариантов осуществления 30-31.

43. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 19-29.

44. Набор, содержащий биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент, определенный по любому из вариантов осуществления 19-29, и/или полинуклеотид, определенный в п.43, и упаковку для вышеупомянутых компонентов.

Краткое описание рисунков

На фиг. 1А и 1В показаны векторы, используемые для клонирования ВСМА человека (фиг. 1А) и ВСМА яванского макака (фиг. 1В).

На фиг. 2А-2D показано расположение эпитопа ВСМВ69 и взаимодействия между ВСМА и ВСМВ69 человека. Фиг. 2А - демонстрация расположения эпитопа. ВСМВ69 связывается с вогнутой поверхностью ВСМА (черные области). Фиг. 2В - карта взаимодействия, на которой показаны прямые

контакты между ВСМА и ВСМВ69. Остатки всех CDR, за исключением CDR-L1, контактируют с ВСМА. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса показаны в виде пунктирных линий, водородные связи представляют собой сплошные линии со стрелками, которые обозначают водородные связи основной цепи и указывают на атомы основной цепи. Остатки ВСМА, которые контактируют как с ВСМВ69, так и с APRIL, заключены в черную рамку. Для определения контактирующих остатков расстояние не должно было превышать 4 Å (для водородных связей пороговое значение составляло 3,5 Å). Фиг. 2С и 2D - вид крупным планом основных взаимодействий ВСМА с легкой (фиг. 2С) и тяжелой (фиг. 2D) цепями ВСМВ69. Водородные связи показаны в виде пунктирных линий с указанием расстояний в ангстремах.

На фиг. 3 показаны остатки эпитопа и паратопа ВСМВ69. Остатки эпитопа и паратопа заштрихованы, области CDR подчеркнуты (определение Кабат), а остатки ВСМА, которые отличаются от человеческих, обозначены жирным курсивом. Показаны только Fab ВСМВ69 и внеклеточные последовательности ВСМА.

На фиг. 4А и 4В показаны области конкуренции между Fab ВСМВ69 и APRIL (фиг. 4А) и Fab ВСМВ69 и ВАFF (фиг. 4В). Структурное наложение комплекса ВСМА/ВСМВ69 на комплексы ВСМА/APRIL и ВСМА/ВАFF, на котором показаны области конкуренции между Fab и лигандом. Отображена поверхность ВСМА, доступная для растворителя. Молекулы Fab и лиганда изображены в виде серого и черного рисунков соответственно. Наложения достигали путем совмещения эквивалентных атомов С α ВСМА в обоих комплексах (среднеквадратическое отклонение (RMSD) составляет 0,9 Å для комплекса APRIL и 1,2 Å для ВАFF).

На фиг. 5 показаны данные поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для ВСМВ72 демонстрируют, что молекула способна связываться с ВСМА человека, яванского макака и мыши. При сравнении с ВСМА человека средняя K_D для ВСМА яванского макака и мыши отличается в около 36 раз и 402 раза соответственно.

На фиг. 6 показано определение EC_{50} для связывания с ВСМВ72 на клеточных линиях ВСМА+. Клеточные линии окрашивали для выявления ВСМА с помощью ВСМВ72. Показаны геометрические средние интенсивности флуоресценции для связывания ВСМВ72 с клетками. Значения EC_{50} указаны в легенде. Насыщение было достигнуто при концентрации около 100 нМ. Среднюю интенсивность флуоресценции использовали для получения значений EC_{50} для клеток U2932 ($EC_{50}=7,92$ нМ), MM1R ($EC_{50}=8,74$ нМ), H929 ($EC_{50}=14,7$ нМ), EJM ($EC_{50}=17,5$ нМ) и LP1 ($EC_{50}=22,3$ нМ). Построение графиков и подгонка данных были выполнены в программе GraphPad Prism 6 с использованием нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра).

На фиг. 7 показан профиль связывания ВСМВ72 в цельной крови. Цельную кровь от трех нормальных человеческих доноров окрашивали моноклональными или поликлональными антителами к ВСМА или ВСМВ72. Выполняли анализ с гейтированием для выявления лимфоцитов в популяции лейкоцитов с использованием стандартных специфических клеточных маркеров. На графиках показана интенсивность окрашивания для одного репрезентативного донора, где сплошные черные линии представляют собой интересующие антитела, а заштрихованные серым цветом области, ограниченные пунктирными линиями, представляют собой соответствующий изотип. У трех нормальных доноров не было выявлено экспрессии ВСМА на лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах или плазматоцитодных дендритных клетках. ВСМВ72 продемонстрировали связывание с Т-клетками CD3+ у всех трех доноров с различной интенсивностью у доноров. ВСМВ72 не связывались с каким-либо другим типом клеток, который исследовали в данном анализе.

На фиг. 8А-8Е показана ВСМВ72-зависимая Т-клеточная активация в присутствии различных клеточных линий ММ. Клетки H929 (фиг. 8А), MM.1R (фиг. 8В), RPMI 8226 (фиг. 8С), U266 (фиг. 8D) и Mv4-11 (фиг. 8Е) подвергали воздействию указанных антител в присутствии Т-клеток от шести нормальных доноров (показаны средние значения доноров \pm СОС (стандартная ошибка среднего)) и блокатора Fc (2 мг/мл) в течение 48 ч. На графиках показаны значения EC_{50} . Статистический анализ: в дополнение к простому факту сходимости модели, для оценки правильности подгонки проверяется ширина 95% доверительного интервала около $\text{Log}EC_{50}$. (Доверительный интервал около $\text{Log}EC_{50}$ используется в связи с тем, что он симметричен; доверительные интервалы около самой EC_{50} не являются таковыми.) Нормальным считается интервал менее ± 2 (или ширина всего 95% доверительного интервала менее 4).

На фиг. 9А и 9В показана сводная таблица значений EC_{50} и максимальной Т-клеточной активации из двух независимых экспериментов с использованием Т-клеток от множества нормальных доноров. Для каждой клеточной линии и для каждого эксперимента показаны индивидуальные значения доноров и средние значения доноров. Нет данных=не исследовали; нет подгонки=программа не смогла построить кривую; ~значения=аппроксимация на основании экстраполяции модели.

На фиг. 10А-10Е показана Т-клеточно-опосредованная ВСМВ72-зависимая цитотоксичность различных клеточных линий множественной миеломы. Клетки H929 (фиг. 10А), MM.1R (фиг. 10В), RPMI 8226 (фиг. 10С), U266 (фиг. 10D) и Mv4-11 (фиг. 10Е) подвергали воздействию указанной концентрации антител в присутствии Т-клеток от шести нормальных доноров (показаны средние значения доноров \pm СОС) и блокатора Fc (2 мг/мл) в течение 48 ч. На графиках показаны значения EC_{50} . Статистический

анализ: в дополнение к простому факту сходимости модели, для оценки правильности подгонки проверяется ширина 95% доверительного интервала около LogEC_{50} . (Доверительный интервал около LogEC_{50} используется в связи с тем, что он симметричен; доверительные интервалы около самой EC_{50} не являются таковыми.) Нормальным считается интервал менее ± 2 (или ширина всего 95% доверительного интервала менее 4).

На Фиг. 11А и 11В показана сводная таблица значений EC_{50} и максимального лизиса из двух независимых экспериментов с использованием Т-клеток от множества нормальных доноров. Для каждой клеточной линии и для каждого эксперимента показаны индивидуальные значения доноров и средние значения доноров. Нет данных=не исследовали; нет подгонки=программа не смогла построить кривую; ~значения=аппроксимация на основании экстраполяции модели.

На фиг. 12 показаны цитотоксичность и Т-клеточная активация клеток Н929. Биспецифические антитела к ВСМА×CD3 (мутантные молекулы ВСМВ72) исследовали в анализе Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности. ВСМА-положительные клеточные линии (Н929) инкубировали с различными концентрациями антител в течение 48 ч в присутствии экзогенных человеческих Т-клеток от нормальных доноров (идентификаторы доноров: М5763 и М6576). Через 48 ч инкубации уничтожение клеток измеряли с использованием способа, основанного на проточной цитометрии (FACS). На фиг. 12А данные показаны в % цитотоксичности. На фиг. 12В показана Т-клеточная активация, которую оценивали посредством усиления экспрессии CD25 на поверхности Т-клетки. В целом точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между Т-клеточными донорами и повторными исследованиями.

На фиг. 13 показана сводная таблица значений EC_{50} для ВСМВ72-опосредованного высвобождения цитокинов. Собирали супернатанты с клетками RPMI 8226 из экспериментов на цитотоксичность (см. пример 12, фиг. 8) и оценивали концентрацию шести различных цитокинов с использованием мультиплексного анализа, основанного на Meso Scale Discovery (MSD). ВСМВ72 (ВСМА×CD3) и контрольные антитела (ВСМА×нуль и нуль×CD3) использовали в различных концентрациях.

На фиг. 14А и 14В показан анализ Т-клеточно-опосредованной ВСМВ72-зависимой цитотоксичности выполняли с использованием ВСМА-положительной клеточной линии Н929. Клетки подвергали воздействию ВСМВ72 в различных концентрациях в присутствии Т-клеток от множества нормальных доноров (в качестве репрезентативного примера показаны сводные данные по трем донорам М7197, М5137 и М6457) и блокатора Fc (2 мг/мл) в течение 48 ч. Соотношение эффектор/мишень (Е/Т) составляло 5:1. На фиг. 14А показан потенциал цитотоксичности, а на фиг. 14В справа показаны кривые Т-клеточной активации, которые были схожими для различных партий ВСМВ72.

На фиг. 15 показано, как клетки Н929 обрабатывали ВСМВ72 (ВСМА×CD3) и контрольными антителами (ВСМА×нуль и нуль×CD3) в течение 30 мин в дозах, указанных на оси X на графике выше, и с помощью способа анализа Simple Western анализировали общий белок в соответствии со стандартным протоколом, приведенным в руководстве пользователя для ProteinSimple. Данные нормализовали с использованием актина в качестве гена "домашнего хозяйства", а соотношения были нанесены на график по оси Y. APRIL и ВАFF индуцировали фосфорилирование P38 в соответствии с ожидаемым результатом, а антитела не оказывали стимулирующего эффекта ни в одной из исследованных концентраций.

На фиг. 16А-16F показаны клетки НЕК-NFκВ, экспрессирующие ВСМА (фиг. 16А, 16С и 16Е) или исходные клетки (фиг. 16В, 16D и 16F) стимулировали $\text{TNF}\alpha$ и различными концентрациями APRIL или ВСМВ72. Анализировали три временные отметки: 16 ч (фиг. 16А и 16В), 24 ч (фиг. 16С и 16D) и 48 ч (фиг. 16Е и 16F). $\text{TNF}\alpha$ индуцировал активацию NF-κВ как в исходных клетках HE-Nf-κВ, так и в клетках НЕК-NF-κВ-ВСМА, а индукция APRIL наблюдалась только в ВСМА-специфичном клеточном типе. ВСМВ72 не оказывали влияния на исходную клеточную линию и приводили к активации только при высоких концентрациях в ВСМА-экспрессирующих клетках.

На фиг. 17А и 17В показано, что Т-клетки не показывают sВСМА-опосредованной и ВСМВ72-зависимой активации. ВСМВ72 (фиг. 17А) и контрольные антитела нуль×CD3 (фиг. 17В) титровали с Т-клетками от двух нормальных доноров (М7077 и М5137) в присутствии различных доз растворимого внеклеточного домена (ECD) ВСМА. Данные: среднее±стандартная ошибка среднего.

На фиг. 18А-18F показано влияние растворимых факторов, sВСМА, APRIL и ВАFF на Т-клеточную активацию и Т-клеточно-опосредованный цитотоксический потенциал ВСМВ72 в клетках Н929. Клетки подвергали анализу на уничтожение в течение 48 ч с использованием Т-клеток донора (М7077 и М6521) и ВСМВ72. Итоговая цитотоксичность изображена на графиках слева, а Т-клеточная активация показана на графиках справа (n=2). Значения EC_{50} для каждого типа обработки указаны в легендах. Показана клеточная цитотоксичность в присутствии sВСМА (фиг. 18А), APRIL (фиг. 18В) и ВАFF (фиг. 18С). Показана Т-клеточная активация в присутствии sВСМА (фиг. 18D), APRIL (фиг. 18Е) и ВАFF (фиг. 18F). Данные: среднее±стандартная ошибка среднего.

На фиг. 19А и 19В показаны сигналы из двух независимых экспериментов нормализовали по максимальному сигналу связывания ВСМА-Fc с APRIL и ВАFF при отсутствии конкурирующих антител. Строили график зависимости связывания ВСМА с APRIL (фиг. 19А) и ВАFF (фиг. 19В) от концентрации

BCMB72 и контрольного антитела (нуль×CD3).

На фиг. 20А-20Е показана цитотоксическая активность BCMB72 в отношении человеческих первичных плазмоцитов ММ. Замороженные мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга пяти различных пациентов (ММ240ВМ (фиг. 20А), ММ259ВМ (фиг. 20В), ММ270ВМ (фиг. 20С), ММ276ВМ (фиг. 20D) и ММ277ВМ (фиг. 20Е)), использовали для оценки связывания с BCMB72 по сравнению с контрольными антителами изотипа IgG4 (CNTO 9412, графики слева), цитотоксичности в отношении плазмоцитов (в середине) и Т-клеточной активации (справа). Для анализа цитотоксичности Т-клетки от нормального здорового донора М7077 экзогенно добавляли в пробы ВММС пациента и инкубировали с BCMB72 (BCMA×CD3), BC3B4 (BCMA×нуль) или CNTO 7008 (нуль×CD3) в течение 48 ч. Во всех пробах донора BCMB72 связывается с плазмоцитами дозозависимым образом и по оси Y фиксировали средние интенсивности флуоресценции. Отмечали уменьшение живых плазмоцитов (CD138+) и сопутствующее увеличение экспрессии CD25 на Т-клетках в ответ на обработку BCMB72. На графиках показаны значения EC₅₀ для Т-клеточной активации.

На фиг. 21 показана эффективность BCMB72 *in vivo* в профилактической модели Н929.

На фиг. 22 показаны сывороточные концентрации растворимого BCMA у мышей с ксенотрансплантатом Н929. Сывороточную концентрацию растворимого BCMA определяли с использованием набора для твердофазного ИФА Human BCMA ELISA kit (R&D Systems). Концентрации растворимого BCMA были значительно ниже у мышей, которым вводили 1 и 0,5 мкг/мышь BCMB72, по сравнению с контрольными мышами с PBS, что хорошо коррелирует с опухолевой нагрузкой у этих животных. Меньшие дозы BCMB72 (0,1 мкг/мышь) не оказывали влияния на концентрации sBCMA или размер опухоли.

Примеры

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем изобретении. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения и которые можно вносить без выхода за рамки объема изобретения.

Пример 1. Материалы.

Молекулы ECD BCMA.

Рекомбинантный человеческий (h) гибридный белок BCMA-Fc (номер по каталогу 193-BC-050), соответствующий аминокислотам 1-54 hBCMA (SEQ ID NO: 1), и рекомбинантный мышинный (m) гибридный белок BCMA-Fc (номер по каталогу 593-BC-050), соответствующий аминокислотам 1-49 mBCMA (SEQ ID NO: 2), приобретали в компании R&D Systems. Рекомбинантный белок BCMA яванского макака получали из кДНК, полученной с использованием технологий генного синтеза (патент США № 6670127; патент США № 6521427). Перед применением все белки тестировали на эндотоксин и биотинилировали для исследований с фаговым пэннингом. Этот материал также использовали для измерений связывания и аффинности.

Растворимый BCMA человека приобретали в компании AB Biosciences (номер по каталогу P011Хр, партия № 033-013) и использовали для исследований по определению характеристик.

Молекулы APRIL, BAFF, BAFF-R и TACI.

Растворимый hAPRIL (номер по каталогу DY884), hBAFF (номер по каталогу 2149-BF), hBAFF-R (номер по каталогу 1162-BR), соответствующий аминокислотам 7-71 hBAFF-R, и hTAC1, соответствующий аминокислотам 2-166 TAC1, приобретали в компании R&D Systems. Для исследований SPR BAFF-R и TAC1 подвергали биотинилированию.

Создание клеточных линий BCMA.

Векторы, несущие BCMA человека (фиг. 1А) и BCMA яванского макака (фиг. 1В), временно трансфицировали в клетки HEK293 *expi* с помощью стандартных способов. Прикрепляющиеся трансфицированные клетки 293F отбирали по стабильной интеграции плазмиды, впоследствии сортировали отдельные клетки и количественно оценивали экспрессию поверхностного рецептора BCMA методом FACS с применением меченого антитела BCMA-PE человека (R&D Systems FAB193P).

Пример 2. Выделение гибридом, экспрессирующих моноклональное антитело к BCMA человека.

Линию трансгенных крыс, синтезирующих человеческий иммуноглобулин (OmniRat®; OMT, Inc.), использовали для создания клеток гибридомы, экспрессирующих моноклональное антитело к BCMA человека. Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_{Hs}, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V_{ks}, связанных с J_к-С_к, и 16 V_{λs}, связанных с J_λ-С_λ). (см., например, Osborn et al. (2013), J. Immunol., 190(4):1481-1490). Соответственно крысы показывают сниженную экспрессию крысиного IgM или κ, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных человеческих моноклональных антител

IgG. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в публикации PCT WO 14/093908, составленной Bruggemann et al.

После иммунизации рекомбинантным ВСМА человека (rhBCMA) эта трансгенная крыса продуцирует человеческие антитела IgG, специфические к ВСМА человека.

Схема иммунизации была следующей: шесть крыс иммунизировали гибридным белком hBCMA-Fc. После 21-дневного режима иммунизации собирали селезенки и лимфатические узлы иммунизированных крыс и использовали их для создания четырех полных библиотек гибридомы. Библиотеки титровали и анализировали посредством твердофазного ИФА для выявления mAb, которые показывали связывание с биотинилированным hBCMA. mAb захватывали на планшете со стрептавидином MSD. После дополнительных подтверждающих тестов супернатанты гибридомы, которые показывали специфическое связывание с ВСМА человека и ВСМА яванского макака, секвенировали, клонировали и экспрессировали и преобразовали в человеческие IgG1 и IgG4.

Пример 3. Очистка антител к ВСМА.

Антитела к ВСМА в осветленных супернатантах культуры захватывали смолой MabSelect SuRe Protein A и элюировали 100 мМ ацетатом натрия (pH 3,5). Содержащие антитела фракции объединяли и быстро нейтрализовали 2,5 М Tris HCl (pH 7,2), впоследствии буферный раствор обменивали на 1×D-PBS или другие желаемые буферные растворы, если таковые были указаны. Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре и рассчитывали коэффициент абсорбции. Чистоту и гомогенность антитела оценивали посредством электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и эксклюзионной ВЭЖХ. Стадию очистки путем эксклюзионной хроматографии с использованием Superdex 200 выполняли, если по данным эксклюзионной ВЭЖХ чистота мономера составляла менее 95%.

Пример 4. Оценка антител к ВСМА в отношении клеточного связывания с ВСМА.

Связывание антител к ВСМА с модифицированными ВСМА-экспрессирующими клетками и раковыми клеточными линиями U2392, EJM, MMIR, U266, OPM2 и RPMI-18226 оценивали с помощью анализа клеточного связывания MSD (Mesoscale) и проточной цитометрии. Целью данного скринингового анализа заключалась в идентификации антител, связывающихся с клетками, экспрессирующими ВСМА, а также перекрестной реактивности с клетками, экспрессирующими ВСМА яванского макака.

Для выполнения анализа клеточного связывания MSD клетки иммобилизовали, а пробы антител к ВСМА анализировали в трех повторениях. Вкратце экспрессионные супернатанты или очищенные антитела к ВСМА нормализовали к 10 мкг/мл. Высевали по 5000 клеток в лунку 384-луночного планшета (MA6000, номер по каталогу L21XB, MSD) и оставляли для прикрепления на 2 ч. После этого клетки блокировали 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS) в PBS (Gibco) в течение 15 мин. Впоследствии добавляли супернатанты антител и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Клетки промывали 3 раза PBS, после чего добавляли меченные рутением вторичные антитела (Jackson Immuno Research) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Впоследствии выполняли дополнительную стадию промывки, после которой добавляли по 35 мкл в лунку буфера для считывания MSD Read buffer T (без поверхностно-активных веществ) и инкубировали в течение 30 мин для обнаружения. Впоследствии выполняли считывание планшетов с помощью MSD Sector 6000. Данные нормализовали к контрольным значениям и отображали на графике с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 5. Молекулы с положительным связыванием считались хитом, если сигнал в 3 раза превышал фоновый уровень. Анализ повторяли для непротиворечивости данных и для дальнейшей разработки отбирали лучше всего связывающиеся молекулы.

Для выполнения проточной цитометрии клетки инкубировали с красителем, окрашивающим живые клетки, и на планшет с U-образным дном 100000 клеток добавляли и центрифугировали для осаждения клеток. К клеткам добавляли титрованные антитела к ВСМА. По истечении периода инкубации клетки осаждали и промывали. К клеткам добавляли меченные AlexaFluor 647 видоспецифичные вторичные антитела и оставляли для инкубации. Клетки осаждали и промывали несколько раз. Клетки повторно суспендировали в соответствующем количестве подвижного буферного раствора и анализировали с помощью FACS CantoII. Клетки гейтировали посредством FSC-A в сравнении с SSC-A по размеру, SSC-A в сравнении с SSC-H по синглетам и красителю, окрашивающему живые клетки. Значения геометрических средних интенсивностей флуоресценции (geoMFI) для популяции живых клеток наносили на график и использовали для расчета значений EC₅₀, если это было возможно, т.е. если кривые были полностью сигмоидальными.

Ингибирование связывания с лигандом APRIL.

Проводили скрининг панели антител к ВСМА в конкурентном анализе связывания APRIL методом твердофазного ИФА. Растворимый человеческий APRIL приобретали в компании R&D systems (номер по каталогу DY884) и оценивали способность антител к ВСМА блокировать связывание APRIL с иммобилизованным ВСМА.

Вкратце 96-луночные прозрачные планшеты Maxisorb обрабатывали 100 мкл 0,5 мкг/мл ВСМА-ECD, приготовленного в PBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Впоследствии

планшеты три раза промывали буферным раствором для твердофазного ИФА, содержащим 0,05% Tween-20 в PBS (R&D Systems, номер по каталогу WA126), и впоследствии блокировали, используя 300 мкл/лунка разбавителя реагента, содержащего 1% BSA в PBS (R&D Systems, номер по каталогу DY995). Для конкурентного связывания антитела к ВСМА добавляли в планшет в объемах 100 мкл и инкубировали в течение 30 мин с последующим добавлением APRIL. Через 30 мин в каждую лунку добавляли 1 нг APRIL и планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C. APRIL без связывания промывали промывочным буфером для твердофазного ИФА и связавшиеся биотинилированные APRIL обнаруживали с использованием конъюгата SA-HRP при оптической плотности 450 нм.

Пример 5. Оценка и выбор подходящих антител.

После завершения экспериментов по оценке было определено, что антитело, полученное из гибридомы M2, под названием ВСМВ69 имеет следующие характеристики:

связывается с рекомбинантным ВСМА человека;

связывается с рекомбинантным ВСМА яванского макака;

показывает слабое связывание с мышинным ВСМА;

связывается как с клетками НЕК, экспрессирующими ВСМА человека, так и с клетками НЕК, экспрессирующими ВСМА яванского макака, при измерении посредством проточной цитометрии;

связывается с человеческими раковыми клеточными линиями, которые экспрессируют ВСМА (U2392, EJM, MMIR, U266, OPM2 и RPMI-18226);

блокирует связывание с APRIL с $IC_{50}=5,9$ нМ.

В результате ВСМВ69 (табл. 4 и 5) экспрессировали и очищали с целью создания биспецифических антител к ВСМА×CD3.

Таблица 4

Последовательности CDR ВСМВ69 (соответствующие SEQ ID NO приведены в скобках)

№	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
ВСМВ69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HGAVAGLFDY (6)	GGNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWSSSDHVV (26)

Таблица 5

Последовательности VH и VL ВСМВ69

Идентификатор mAb AA	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
ВСМВ69	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSGSYFWGWRQPPGKLEWI GSIYYSGITYYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARH DGAVAGLFDYWGQGLVTVSSA	27	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCG GNNIGSKSVHWYQPPGQAPVVV VYDDSDRPSGIPERFSGNSNGNT ATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHVVFEGGKLTIVL	28

Пример 6. Кристаллическая структура Fab-фрагмента антитела к ВСМА.

Кристаллическую структуру одного антитела к ВСМА (ВСМВ69) определяли в несвязанной форме Fab, а также после связывания с ВСМА человека для оценки взаимодействий антитела/антигена на атомном уровне, улучшения понимания механизма действия антитела и поддержания каких-либо требуемых усилий по конструированию антитела.

Материалы.

Fab ВСМА с гистидиновой меткой (SEQ ID NO: 75 и 76; далее просто ВСМВ69 Fab) экспрессировали в клетках НЕК293 и очищали с помощью аффинной и эксклюзионной хроматографии. Fab помещали в 130 мМ NaCl, 20 мМ MES, pH 7,4.

Внеклеточную область ВСМА человека (остатки 5-51 SEQ ID NO: 1; далее просто ВСМА) с гистидиновой меткой на С-конце экспрессировали с использованием бакуловиральной системы и очищали посредством аффинной и эксклюзионной хроматографии. Белок помещали в 50 мМ NaCl, 20 мМ Tris, pH 8.

Кристаллизация.

Комплекс ВСМА/ВСМВ69 Fab.

Комплекс Fab/антигена получали, смешивая ВСМА с ВСМВ69 Fab в молярном соотношении 3,8:1 (избыток ВСМА) в течение около 16 ч при температуре 4°C с одновременной заменой буферного раствора на 20 мМ HEPES, pH 7,5. Впоследствии комплекс элюировали из колонки моноS 5/50 с градиентом 51-63 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, pH 7,5, и концентрировали до 17 мг/мл. Кристаллы, приемлемые для дифракции рентгеновских лучей, получали из ПЭГ 25% 3 кДа, 0,2 М MgCl₂, 0,1 М Mes, pH 6,5, с помощью метода диффузии паров в сидячей капле при 20°C с микрозасеванием.

ВСМВ69 Fab.

ВСМВ69 Fab концентрировали до 9 мг/мл без дополнительной очистки. Кристаллы, приемлемые для дифракции рентгеновских лучей, получали из 2 М (NH₄)₂SO₄, 5% MPD, 0,1 М Mes pH 6,5 с помощью

метода диффузии паров в сидячей капле при 20°C.

Сбор данных рентгена и определение структуры.

Для сбора данных рентгена один кристалл замачивали на несколько секунд в маточном растворе, содержащем раствор криопротектора, с добавлением 20% глицерина и впоследствии мгновенно замораживали в жидком азоте. Данные о дифракции рентгеновских лучей для комплекса ВСМА/ВСМВ69 собирали с помощью детектора Rayonix 300HS CCD в канале вывода пучка CMCF-08ID центра Canadian Light Source (CLS), а данные рентгенографического исследования несвязанного ВСМВ69 Fab собирали с помощью детектора Dectris Pilatus 6M Pixel Array в канале вывода пучка 17-ID центра Advanced Photon Source (APS) в Аргоннской национальной лаборатории. Данные дифракции обрабатывали с помощью программного обеспечения HKL (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Обработку данных дифракции рентгеновских лучей выполняли в режиме осцилляции. *Methods in Enzymology*, 276:307-326).

Структуру восстанавливали методом молекулярного замещения (MR) с помощью Phaser (Read, R.J. (2001)). *Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 57:1373-82). В случае структуры несвязанного Fab поисковой моделью для МЗ был Fab 5j8 гемагглютинина против вируса гриппа (код PDB: 4M5Y). В случае комплекса ВСМА/Fab поисковыми моделями для MR были кристаллические структуры ВСМА (код PDB: 1XU2) и структура несвязанного Fab ВСМВ69. Структуры уточняли с помощью PHENIX (Adams, P.D., Gopal, K., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Pai, R.K., Read, R.J., Romo, T.D., Sacchettini, J.C, Sauter, N.K., Storoni, L.C. & Terwilliger, T.C. (2004), Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination, *J. Synchrotron Radiat.*, 11:53-5), а корректировки модели выполняли с использованием COOT (Emsley P. & Cowtan, K. (2004), Coot: Model building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr.*, D60: 2126-2132). Все остальные кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета программ CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Все молекулярные графики получали с помощью PyMol (DeLano, 2002), The PyMOL molecular graphics system, Palo Alto, CA, USA, Delano Scientific).

Статистические данные как для структуры несвязанного Fab ВСМВ69, так и комплекса показаны в табл. 6.

Таблица 6

Кристаллографические данные для комплекса ВСМА/ВСМВ69 Fab и несвязанного ВСМВ69 Fab

	Комплекс	Несвязанный Fab
<i>Идентификатор структуры в CBIS</i>	PS41	PS40
<i>Параметры кристалла</i>		
Кристаллизирующий раствор		
0,1 М буферный раствор	Mes pH 6,5	Mes pH 6,5
Осаждающее вещество	25% ПЭГ 3 кДа	2 М (NH ₄) ₂ SO ₄
Добавка	0,2 М MgCl ₂	5% MPD
Пространственная группа	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Молекулы/асимметричный блок	2	1
<i>Элементарная ячейка</i>		
a, b, c (Å)	62,9, 87,1, 88,7	64,3, 71,1, 123,0
α, β, γ (°)	90,0, 94,8, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Содержание растворителя (%)	47	56
<i>Данные рентгеноструктурного анализа*</i>		
Разрешение (Å)	50,00-2,00	50,00-2,70
Оболочка высокого разрешения (Å)	(2,07-2,00)	(2,75-2,70)
Измеренные отражения	235 905	91 256
Полнота (%)	99,9 (99,8)	99,9 (99,9)
Избыток	3,7 (3,6)	5,7 (4,8)
R _{sum} (%)	10,0 (52,7)	14,8 (51,9)
<I/σ>	13,3 (2,9)	13,5 (3,1)
<i>Оптимизация</i>		
Разрешение (Å)	45,4-2,0	34,2-2,7
Количество отражений	64 157	15 890
Число всех атомов	7 001	3149
Число атомов воды	89	10
R _{work} /R _{free} (%)	19,0/23,7	18,5/24,0
RMSD длины связи (Å)	0,009	0,004
RMSD угла связи (°)	1,190	0,869

Средний B-фактор (\AA^2)	31,0	51,1
MolProbity		
Предпочтительное значение Рамачандрана (%)	97,32	96,86
Допустимое значение Рамачандрана (%)	2,68	2,90
Отклоняющиеся значения Рамачандрана (%)	0,00	0,24
Отклоняющиеся ротамеры (%)	0,39	0,59
Значение столкновения	3,20	1,96

Эпитоп, паратоп и взаимодействия.

BCMB69 распознает конформационный эпитоп, состоящий из остатков в областях β -шпильки (остатки Y13-H19) и спирали-петли-спирали (остатки L26, R27 и N31-L35) BCMA (фиг. 3 и 4). Эпитоп BCMB69 содержит область площадью около 830\AA^2 на BCMA и содержит мотив DXL, связывающий лиганд (остатки D15-L18 в повороте типа I β -шпильки), который выступает в небольшую полость, покрытую определяющими комплементарность областями (CDR) антитела. Лейцин 17 на верхушке поворота DXL полностью погружен в полость антитела и широко взаимодействует с BCMB69. Другим распространенным остатком в эпитопе является Arg27, который расположен на 3_{10} -спирали h1 и посредством нескольких водородных связей контактирует с CDR тяжелой цепи.

Паратоп BCMB69 состоит из остатков всех CDR, за исключением CDR-L1 (фиг. 2 и 3). Тяжелая цепь имеет в два раза больше контактов с BCMA по сравнению с легкой цепью. Небольшие боковые цепи верхушки петли CDR-H3 (102-GAVAG-106) (SEQ ID NO: 77) способствуют вставке CDR-H3 в BCMA и созданию обширных контактов антитела/антигена (40% от всех контактов обусловлены CDR-H3). CDR BCMB69 накладываются на вогнутую поверхность структуры BCMA в форме кресла, при этом CDR-L2 (остатки Y48, D52, P54, S55), CDR-H1 (остатки G32-Y34) и CDR-H3 (D101, A103, V104, Y110) контактируют с "сиденьем", образованным спиралью h1 и петлей h1h2, а CDR-L3 (остатки W90, S92, D95), CDR-H1 (F35), CDR-H2 (Y54, Y60) и CDR-H3 (H100, G102, A103, A105) взаимодействуют со "спинкой", образованной β -шпилькой BCMA. Leu35, единственный остаток эпитопа в "ножке кресла" (спираль h2), имеет контакты Ван-дер-Ваальса с остатком D52 CDR-L2.

BCMA имеет небольшой (около 50 остатков) и компактный внеклеточный домен. Для связывания неконкурирующих антител или лигандов с BCMA доступна ограниченная поверхность. Большинство остатков эпитопа BCMB69 также связываются с APRIL (12 из 14 остатков эпитопа) и BAFF (9 из 14 остатков). В случае APRIL, который представляет собой лиганд BCMA с наивысшей аффинностью, единственными не используемыми совместно остатками являются F14 и S16 (фиг. 2B), а в случае BAFF такими остатками являются F14, L26, T32, P33 и L35. Петля DXL захватывается обоими лигандами и BCMB69.

Предложенные механизмы действия BCMB69.

BCMB69 представляет собой потенциальную молекулу для перенаправления T-клеток к раковым клеткам MM. Ожидается, что структура и местоположение эпитопа BCMB69 не будет оказывать негативного влияния на уничтожение раковых клеток, опосредованное биспецифическим антителом к BCMB69 \times CD3. Доступное местоположение эпитопа позволяет Fab-плечу BCMB69 связываться с мембраносвязанным BCMA, а другое Fab-плечо остается связанным с CD3 в T-клеточной мембране.

BCMB69 также может нарушать сигнальные пути APRIL и BAFF в плазмочитах посредством пространственной закупорки и прямой конкуренции за сайт связывания BCMA. Наложение структуры BCMA/BCMB69 на структуры BCMA/APRIL и BCMA/BAFF (Liu, Y., Hong, X., Kappler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C.H., Martin, W.E., Murphy, R.C., Shu, H.B., Dai, S. & Zhang, G. (2003), Nature, 423:49-56; Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J.A., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skelton, N.J., Kelley, R.F. & Starovasnik, M.A. (2005). J. Biol. Chem., 280:7218-7227) демонстрирует области конкуренции между BCMB69 и APRIL, BAFF (фиг. 2B, 4A и 4B), что делает для BCMA невозможным связывание одновременно с антителом и естественным лигандом. APRIL и BAFF могут передавать сигнал, используя другие рецепторы, такие как TAC1 и BAFF-R, и мыши с нокаутным BCMA сохраняют жизнеспособность. Таким образом, блокировка активности APRIL и BAFF посредством закупорки BCMA может не быть критически токсичной для пациентов с MM.

Пример 7. Структурное проектирование мутантов BCMB69.

В результате расчетной оценки мотивов посттрансляционной модификации и риска агрегирования варибельного домена несвязанного BCMB69 выявлен умеренный риск изомеризации остатков D101-G102 (CDR-H3) и гидрофобного участка площадью 486\AA^2 в области CDR, что может создавать риск агрегирования. Наиболее открытые гидрофобные остатки в указанном участке представляют собой I58 (CDR-H2), F35 (CDR-H1) и V104 (CDR-H3; V104 имел значение в модели гомологии Fv, но не в кристаллической структуре Fab). Для устранения рисков изомеризации и агрегирования в варибельном домене BCMB69 были рационально спроектированы различные мутации (табл. 7).

Перечень мутантов ВСМВ69

Набор №	№ клона	Мутация	Цель
1	ВСМВ117	G152A ^L	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
1	ВСМВ118	G102A ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
1	ВСМВ119	D101E ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
1	ВСМВ120	D101S ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
1	ВСМВ121	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H , P37K ^L , V44L ^L , V83D ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности
1	ВСМВ122	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Генеративные мутации VH для снижения гидрофобности
1	ВСМВ123	G32S ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, снижение гидрофобности
1	ВСМВ124	F35Y ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, снижение гидрофобности
1	ВСМВ125	D101E ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, устранение изомеризации
1	ВСМВ126	D101S ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, устранение изомеризации
1	ВСМВ127	G102A ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, устранение изомеризации
1	ВСМВ128	V104T ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, снижение гидрофобности
1	ВСМВ129	I58S ^H	Влияние на доступ одиночной мутации, снижение гидрофобности

1	BCMB130	G102A ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
1	BCMB131	D101E ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Устранение изомеризации и снижение гидрофобности
2	BCMB176	G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности
2	BCMB177	I58R ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности
2	BCMB178	I58W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности
2	BCMB179	D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Устранение изомеризации и гидрофобности
2	BCMB180	D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Устранение изомеризации и гидрофобности
2	BCMB181	D101W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB182	D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB183	I58R ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB184	I58R ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB185	I58R ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB186	I58W ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB187	I58W ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации
2	BCMB188	I58W ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Генеративные мутации VH и VL для снижения гидрофобности и устранения изомеризации

Последовательности CDR и последовательности VH и VL для структурных мутантов BCMB69 показаны в табл. 8 и 9 соответственно.

Таблица 8

Последовательности CDR мутантов BCMB69 (соответствующие SEQ ID NO приведены в скобках)

№	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB118	SGSYFWG	SIYYSGITYYNPSL	HDAATAGLFDY	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSDHVV

046105

	(4)	KS (5)	(9)	(24)	(25)	(26)
BCMB119	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HEGATAGLFDY (12)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB120	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HSGATAGLFDY (15)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB121	SSSYWGW (7)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB122	SSSYWGW (7)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB123	SSSYWGW (7)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB124	SGSYWGW (10)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB125	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB126	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HSGAVAGLFDY (17)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB127	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB130	SGSYWGW (10)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB131	SGSYWGW (10)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB176	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB177	SSSYFWG (13)	SIYYSGSTYYNPSL KS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB178	SSSYFWG (13)	SIYYSGWYYNPSL KS (11)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB179	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB180	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB181	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HWGATAGLFDY (22)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB182	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSL KS (5)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB183	SSSYFWG	SIYYSGRYYNPSL	HQGATAGLFDY	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSDHVV

	(13)	KS (14)	(20)	(24)	(25)	(26)
BCMB184	SSSYFWG (13)	SIYYSGRYYNPSL KS (14)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSTDHVV (26)
BCMB185	SSSYFWG (13)	SIYYSGRYYNPSL KS (14)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSTDHVV (26)
BCMB186	SSSYFWG (13)	SIYYSGWYYNPSL KS (11)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSTDHVV (26)
BCMB187	SSSYFWG (13)	SIYYSGWYYNPSL KS (11)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSTDHVV (26)
BCMB188	SSSYFWG (13)	SIYYSGWYYNPSL KS (11)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSTDHVV (26)

Таблица 9

Последовательности VH и VL мутантов BCMB69

Идентификатор mAb AA	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
BCMB117	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNP SLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGGT LVTVSSA	57	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFVFG GGTKLTVL	28
BCMB118	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNP SLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDAAT AGLFDYWGGT LVTVSSA	29	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFVFG GGTKLTVL	28
BCMB119	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNP SLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHEGAT AGLFDYWGGT LVTVSSA	31	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFVFG GGTKLTVL	28
BCMB120	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNP SLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHSGAT AGLFDYWGGT LVTVSSA	32	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFVFG GGTKLTVL	28
BCMB121	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGGT LVTVSSA	33	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDSSTDHVVFVFG GGTKLTVL	30
BCMB122	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKN	33	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS	28

	QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA		RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB123	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	34	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB124	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	35	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB125	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHEGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	36	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB126	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHSGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	37	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB127	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	38	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB128	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	39	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB129	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	40	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB130	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHDAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	41	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL
BCMB131	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSGSYYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHEGAV AGLFDYWGQGLVTVSSA	42	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHV VFG GGTKLTVL

BCMB176	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHDGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	58	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB177	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHDGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	43	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB178	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGWTTYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHDGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	44	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB179	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHQGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	45	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB180	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHHGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	46	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB181	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHWGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	47	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB182	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHYGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	48	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB183	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS	49	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD	28
	IYYSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHQGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA		SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	
BCMB184	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHHGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	50	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28
BCMB185	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARHYGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	51	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI S RVEAGDEAVYYCQVWDS S SDHVVF GGTKLTVL	28

BCMB186	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGWTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHQGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	52	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFG GGTKLTVL	28
BCMB187	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGWTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHGGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	53	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFG GGTKLTVL	28
BCMB188	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGS IYYSGWTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARHYGAT AGLFDYWGQGLVTVSSA	54	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN NIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDD SDRPSGIPERFSGNSGNTATLTIS RVEAGDEAVYYCQVWDSSTDHVVFG GGTKLTVL	28

Таким образом, помимо BCMB69 28 мутантов экспрессировали и очищали, как описано в примере 3, и оценивали на связывание с BCMA-экспрессирующими клетками посредством проточной цитометрии, как описано в примере 4. Семь из 28 мутантов, связанных с клетками, экспрессирующими BCMA, использовали в дальнейшем с целью получения набора биспецифических антител к BCMA×CD3.

Пример 8. Получение антител к BCMA и CD3 в биспецифическом формате в IgG4 S228P, L234A, L235A.

Антитела к BCMA экспрессировали в виде IgG4, имеющих в Fc замены S228P, L234A и L235A (номерация согласно реестру ЕС). Кроме того, было создано моноспецифическое антитело CD3B19 к CD3, содержащее тяжелые и легкие цепи, имеющее последовательности SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 соответственно.

Моноспецифические антитела очищали с помощью стандартных способов с использованием колонки с белком А (колонка HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела к BCMA×CD3 создавали, объединяя моноспецифическое mAb к CD3 и моноспецифическое mAb к BCMA во время обмена Fab-плечами in-vitro (как описано в WO 2011/131746). Вкратце около 1-20 мг/мл антитела к BCMA/CD3 в молярном соотношении 1:1 (или в некоторых случаях дополнительно 6% одного исходного антитела для деплеции другого) в PBS, pH 7-7,4, и 75 мМ 2-меркаптоэтанолamina (2-MEA) смешивали вместе и инкубировали при 31°C в течение 5 ч, после чего удаляли 2-MEA посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с помощью стандартных способов. Образование биспецифических антител к BCMA×CD3 анализировали посредством катионообменной ВЭЖХ (СЕХ) или гидрофобной ВЭЖХ (НІС). При желании биспецифические антитела к BCMA×CD3 очищали посредством препаративной СЕХ или НІС для удаления остаточных исходных антител.

Тяжелые и легкие цепи репрезентативных биспецифических антител к BCMA×CD3 представлены ниже в табл. 10. BCMB178 имело слабую экспрессию при комбинировании с плечом CD3, таким образом, дополнительно не оценивалось.

Таблица 10

Последовательности тяжелых и легких цепей биспецифических антител

Антитело		Аминокислотная последовательность
BCMB72	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAWYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGSPVFLFPKPKDT LMI SRTEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSQRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB69 (SEQ ID NO: 65)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGITYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG AVAGLFDYWQGTLLTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGKTXYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 2 BCMB69 (SEQ ID NO: 76)	SYVLTQPPSVSVAPGQATARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFVGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSQRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
BC3B7	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSQRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB117 (SEQ ID NO: 67)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGITYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG AVAGLFDYWQGTLLTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGKTXYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

		RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 2 BCMB117 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFVGGG TKLTVLQGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
BC3B8	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVTVQEPSTVSPGGTTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLQGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB123 (SEQ ID NO: 68)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG AVAGLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 2 BCMB123 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFVGGG TKLTVLQGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
BC3B9	Тяжелая цепь 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI

	CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB128 (SEQ ID NO: 69)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG ATAGLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLFPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 2 BCMB128 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSTSDHVVFGGG TKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTV EKTVAPTECS
BC3B10	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 D3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA

		DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB129 (SEQ ID NO: 70)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG AVAGLFDYWQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 2 BCMB129 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDSD DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEAVYYCQVWSDSSDHVVFVGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
BC3B11	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAWYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVTEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICALWYNSLWVFGG GKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB176 (SEQ ID NO: 71)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYFWGWIRQPPGKLEWIG SIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG ATAGLFDYWQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

	Легкая цепь 2 BCMB176 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDS DRPSGIPERFSGNSNGNTATLTI SRVEAGDEAVYYCQVWDS SSSDHVVFVGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
BC3B12	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO: 56)	QTVVTEPESLTVSPGGTTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPECS
	Тяжелая цепь 2 BCMB177 (SEQ ID NO: 72)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYFWGWIRQPPGKGLEWIG SIYYSGRTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHDG ATAGLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLFPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 2 BCMB177 (SEQ ID NO: 66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDS DRPSGIPERFSGNSNGNTATLTI SRVEAGDEAVYYCQVWDS SSSDHVVFVGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS

Пример 9. Определения аффинности связывания с ВСМА антител к ВСМА и биспецифических антител к ВСМА×CD3.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) использовали для измерения значений аффинности связывания с ВСМА человека антител к ВСМА, используемых для создания биспецифических антител к CD3.

Протокол, применяемый для SPR, был схожим с таковым, описанным в примере 4. Результаты, показанные в табл. 11, указывают, что все пробы связывались с мономерным антигеном ВСМА с различными аффинностями. Аффинности связывания исходных mAb (BCMB69) составляли ~1,4 нМ. Аффинности связывания BCMB117 и BCMB128 находились в диапазоне BCMB69, а аффинности BCMB123, BCMB129, BCMB176 и BCMB177 были относительно более слабыми (в 3-15 раз) в связи с более быстрыми скоростями диссоциации. Для оценки данных о воспроизводимости все пробы анализировали по меньшей мере в трех повторениях и фиксировали стандартные отклонения.

Таблица 11

Аффинности связывания mAb к ВСМА с
мономерным человеческим ВСМА, определенные посредством SPR

mAb	k_{on} ($\times 10^6$ 1/Мс)	k_{off} ($\times 10^{-3}$ 1/с)	K_D (нМ)
BCMB69	2,74 \pm 0,02	3,95 \pm 0,19	1,44 \pm 0,05
BCMB117	2,57 \pm 0,21	3,42 \pm 0,25	1,34 \pm 0,20
BCMB123	2,14 \pm 0,04	11,0 \pm 1,33	5,12 \pm 0,69
BCMB128	4,20 \pm 0,13	8,70 \pm 0,61	2,07 \pm 0,21
BCMB129	1,54 \pm 0,06	8,43 \pm 0,44	5,47 \pm 0,13
BCMB176	4,00 \pm 0,05	28,8 \pm 1,25	7,18 \pm 0,22
BCMB177	2,80 \pm 0,22	56,6 \pm 5,54	20,2 \pm 1,57

SPR также использовали для измерения значения аффинности биспецифических антител к ВСМА \times CD3 по отношению к ВСМА человека и яванского макака. Результаты в табл. 12 указывают, что все пробы связывались с антигенами Fc-ВСМА с различными аффинностями. Аффинности связывания BC3B7 и BC3B9 с ВСМА человека находились в диапазоне BCMB72, а аффинности оставшихся биспецифических антител были в 2-3 раза слабее по сравнению с BCMB72. В отношении Fc-ВСМА яванского макака аффинности BC3B7 и BC3B9 были в 2-3 раза сильнее, чем BCMB72 (K_D 0,65-0,37 нМ соответственно), а сила связывания оставшихся mAb была схожей с BCMB72 (K_D ~0,8-1,2 нМ). Для оценки данных о воспроизводимости все пробы анализировали по меньшей мере в трех повторениях и фиксировали стандартные отклонения.

Таблица 12

Аффинности связывания антител к ВСМА \times CD3 с Fc-ВСМА, определенные посредством SPR

ВСМА \times CD3	Fc- ВСМА	k_{on1} ($\times 10^6$ 1/Мс)	k_{off1} ($\times 10^{-3}$ 1/с)	K_{D1} (нМ)	k_{on2} ($\times 10^{-3}$ 1/с)	k_{off2} ($\times 10^{-4}$ 1/с)	Конечная K_D (нМ)
BCMB72 (B69 \times B219)	Hu	1,35 \pm 0,11	2,08 \pm 0,80	1,51 \pm 0,45	6,56 \pm 1,27	2,79 \pm 0,55	0,06 \pm 0,01
	Cy	1,26 \pm 0,12	4,83 \pm 0,28	3,87 \pm 0,57	1,06 \pm 0,10	7,85 \pm 1,04	1,65 \pm 0,26
BC3B7 (B117 \times B219)	Hu	1,48 \pm 0,09	1,58 \pm 0,30	1,07 \pm 0,20	4,97 \pm 0,67	2,94 \pm 0,54	0,06 \pm 0,01
	Cy	1,38 \pm 0,07	4,17 \pm 0,19	3,04 \pm 0,25	1,50 \pm 0,06	4,15 \pm 0,53	0,65 \pm 0,04
BC3B8 (B123 \times B219)	Hu	1,35 \pm 0,08	1,23 \pm 0,24	0,91 \pm 0,16	3,13 \pm 0,48	5,94 \pm 0,82	0,14 \pm 0,01
	Cy	1,09 \pm 0,05	7,34 \pm 0,21	6,77 \pm 0,48	1,94 \pm 0,08	3,26 \pm 0,43	0,97 \pm 0,09
BC3B9 (B128 \times B219)	Hu	2,58 \pm 0,14	2,05 \pm 0,75	0,79 \pm 0,25	5,06 \pm 1,12	3,64 \pm 0,36	0,05 \pm 0,01
	Cy	2,18 \pm 0,06	4,23 \pm 0,23	1,94 \pm 0,14	1,60 \pm 0,09	3,76 \pm 0,52	0,37 \pm 0,04
BC3B10 (B129 \times B219)	Hu	1,02 \pm 0,07	1,55 \pm 0,31	1,50 \pm 0,22	4,53 \pm 0,64	5,31 \pm 1,20	0,16 \pm 0,03
	Cy	0,93 \pm 0,04	6,36 \pm 0,28	6,84 \pm 0,48	1,65 \pm 0,07	3,59 \pm 0,50	1,22 \pm 0,17

BC3B11 (B176 x B219)	Hu	2,26 ± 0,16	1,32 ± 0,15	0,58 ± 0,07	2,52 ± 0,32	6,89 ± 1,17	0,12 ± 0,02
	Cy	1,93 ± 0,10	6,83 ± 0,11	3,56 ± 0,23	1,47 ± 0,04	3,95 ± 0,76	0,75 ± 0,11
BC3B12 (B177 x B219)	Hu	1,78 ± 0,09	1,29 ± 0,05	0,72 ± 0,05	1,29 ± 0,15	5,57 ± 0,38	0,22 ± 0,03
	Cy	1,48 ± 0,10	8,31 ± 0,30	5,65 ± 0,46	1,46 ± 0,07	3,37 ± 0,43	1,06 ± 0,15

Аффинности связывания биспецифических антител к BCMA×CD3.

(BCMB72) с гибридными белками Fc-BCMA (человека, яванского макака и мыши) измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы Biacore T200 (GE Healthcare, штат Нью-Джерси).

В проточных ячейках 2, 3 и 4 содержащего стрептавидин сенсорного чипа (GE Healthcare, № изделия BR-1005-31) иммобилизовали биотинилированный слитый с Fc BCMA человека, яванского макака или мыши соответственно (содержание иммобилизованного BCMA составляло 12-16 отвечающих единиц (RU)); белки Fc-BCMA человека (R&D Systems; № изделия 193-FC), яванского макака (собственного изготовления; номер по каталогу BCMW6.001) и мыши (R&D Systems; № изделия 593-BC) подвергали биотинилированию самостоятельно). В проточной ячейке 1 не иммобилизовали никаких белков и ее использовали в качестве эталонной поверхности. Эксперименты с кинетикой связывания проводили при 25°C в подвижном буфере (PBS pH 7,4, 0,005% P20, 3 mM EDTA). BCMB72 получали в подвижном буферном растворе, начиная со 100 нМ и до 0,16 нМ и используя 5-кратные разведения. Эти растворы вводили в течение 5 мин (фаза ассоциации) при скорости 50 мкл/мин, а диссоциацию отслеживали в течение 15 мин, используя протекающий подвижный буферный раствор. Поверхность чипа регенерировали короткими инъекциями глицина (pH 1,5) и подвижного буферного раствора при скорости 100 мкл/мин. Анализ кинетики связывания, оценивающий взаимодействия BCMB72 с Fc-BCMA, выполняли путем двойного сравнения данных с эталоном посредством вычитания кривых, построенных при введении буферного раствора, из кривых, построенных при инъекциях аналита, из которых вычитали эталон. Построение общих кинетических сенсограмм выполняли с помощью модели связывания с двумя состояниями, используя программу Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare, штат Нью-Джерси). Результаты аффинности связывания, полученные в модели связывания с двумя состояниями для различных типов BCMA, выражены в виде первого комплекса (K_{D1}) и конечного комплекса (K_D) (фиг. 5).

Пример 10. Т-клеточная активация относительно мишени и цитотоксическая активность антител к BCMA×CD3 в присутствии иммортализованных клеточных линий множественной миеломы.

Оценивали активацию Т-клеток, опосредованную антителами к BCMA×CD3. Вкратце BCMB72 (BCMA×CD3) и контрольные антитела (BCMA×нуль и нуль×CD3) разводили до 800 мкг/мл в PBS.

Титрование выполняли, используя 4-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. В последний столбец добавляли только PBS (контроль с несущей средой).

Клетки-мишени культивировали в среде RPMI 1640 без антибиотиков, обогащенной GlutaMAX, FBS 10% и 25 mM HEPES (культуральная среда). На первые сутки (1 сутки) подсчитывали клетки-мишени и 10 миллионов клеток центрифугировали при 1350 об/мин в течение 3 мин, после чего отделяли супернатанты. Краситель для оценки пролиферации CellTrace CFSE разводили в 18 мкл стерильного DMSO и 1 мкл раствора разводили в 10 мл стерильного PBS. Клеточные осадки повторно суспендировали в 1 мл разведенного CFSE и инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин, защитив от попадания прямого солнечного света. После инкубации 1 мл HI FBS добавляли к клеточной суспензии для блокировки избытка CFSE. Клетки дважды промывали в RPMI-1640, используя FBS 10%. После разведения в 10 мл RPMI клетки подсчитывали, а жизнеспособность клеток фиксировали в протоколе. Клетки разводили до $2,2 \times 10^5$ /мл и инкубировали при 37°C до применения.

Пан-Т-клетки от нормальных доноров размораживали при 37°C в водяной бане, после чего содержимое флаконов для заморозки переносили в конические флаконы объемом 50 мл и разводили в 15 мл холодной культуральной среды. Впоследствии клетки центрифугировали при 1350 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Отделяли супернатанты, а клеточные осадки разводили в 5-10 мл культуральной среды. Подсчитывали Т-клетки и фиксировали жизнеспособность. Впоследствии клетки разводили в культуральной среде до $1,1 \times 10^6$ /мл.

2×10^5 Клеток-мишеней добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном с последующим добавлением блокатора Fc (до конечной концентрации 2 мг/мл). Все клеточные линии инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин для блокировки активности Fc-рецептора. В лунки добавляли 1×10^5 Т-клеток (соотношение эффектор: мишень 5:1). После смешивания мишеней с Т-клетками

в каждую лунку добавляли 20 мкл разведенных антител к ВСМА×CD3. Планшеты инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через двое суток планшеты центрифугировали при 1350 об/мин в течение 3 мин при 4°C и 100 мкл супернатантов переносили в отдельный планшет и хранили при -80°C для анализа высвобождения цитокинов. Клетки промывали в 200 мкл PBS и инкубировали в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200) и антител к CD25, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (разведение 1:50), в течение 20 мин при комнатной температуре. Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки анализировали с использованием FACSCanto II и FlowJo 7.6 в отношении цитотоксичности для мишеней (% мишеней) и Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра), используя метод наименьших квадратов.

На фиг. 8 показано, что ВСМВ72 способствует устойчивой Т-клеточной активации относительно мишени при оценке посредством увеличения экспрессии CD25 на поверхности Т-клетки. Блокатор Fc использовали для предотвращения зависящего от Fc-рецептора связывания антител с клетками-мишенями. В целом точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между донорами Т-клеток. Для ВСМА⁺ клеток максимальная активация составляла 45-85%, а для ВСМА⁻ клеток - 4-10% (эквивалентно фоновым уровням). На фиг. 9 показана сводная таблица значений EC₅₀ и максимальной Т-клеточной активации из двух независимых экспериментов с использованием Т-клеток от множества нормальных доноров.

На фиг. 10 показано, что ВСМВ72 обладал устойчиво сильной цитотоксичностью в отношении ВСМА⁺ клеточных линий. Блокатор Fc использовали для предотвращения зависящего от Fc-рецептора связывания ВСМВ72 с клетками-мишенями. В целом точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между донорами Т-клеток. Для ВСМА⁺ клеток максимальный лизис составлял 62-97%, а для ВСМА⁻ клеток - 4-18%. На фиг. 11 показана сводная таблица значений EC₅₀ и максимального лизиса из двух независимых экспериментов с использованием Т-клеток от множества нормальных доноров.

Оставшиеся шесть антител к ВСМА×CD3 продемонстрировали максимальную цитотоксичность 83-93% (фиг. 12А) и Т-клеточную активацию в диапазоне 74-83% в отношении ВСМА⁺ клеток Н929 при использовании Т-клеток от двух различных доноров (фиг. 12В). Эти шесть молекул антител к ВСМА×CD3 проявляют высокую активность в уничтожении ВСМА⁺ клеток-мишеней со значением EC₅₀ в диапазоне от 0,04 до 0,09 нМ.

Пример 11. Эффективность связывания ВСМВ72 на ВСМА⁺ клеточных линиях.

Оценивали значения EC₅₀ для связывания ВСМВ72 с различными ВСМА⁺ злокачественными клеточными линиями. Вкратце биспецифическое антитело ВСМВ72 (ВСМА×CD3) разводили до 750 мкг/мл в PBS. Титрование выполняли, используя 3-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. В последний столбец добавляли только PBS (контроль с несущей средой).

Клетки-мишени Н929 культивировали в среде RPMI 1640 без антибиотиков, обогащенной GlutaMAX, FBS 10% и 25 мМ HEPES (культуральная среда). Для анализа измеряли плотность и жизнеспособность клеток-мишеней, а впоследствии клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Впоследствии клеточные осадки промывали в 10 мл PBS и снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Клетки повторно суспендировали в PBS в концентрации 5,5×10⁵ клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном добавляли 90 мкл клеточной суспензии с последующим добавлением разведенных ВСМВ72 в количестве 10 мкл/лунка. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч в темноте, впоследствии центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и отделяли супернатанты. Клеточные осадки дважды промывали в 200 мкл буферного раствора для FACS.

Меченные PE вторичные антитела к человеческому Fc IgG4 растворяли в буферном растворе для FACS в соотношении 1:25 и в соответствующие лунки добавляли 50 мкл смеси. Пробы инкубировали в течение 20 мин при 4°C, промывали в буферном растворе для FACS, как описано выше, и разводили в 150 мл буферного раствора для FACS с целью анализа на FACSCanto II. Данные анализировали с помощью FlowJo 7.6 на связывание с ВСМВ72, а построение графиков и подгонку данных выполняли в GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента, используя метод наименьших квадратов.

Как видно на фиг. 6, ВСМВ72 способны связываться со всеми исследованными ВСМА⁺ клеточными линиями. Значение EC₅₀ для связывания с клетками Н929 составляло 14,7 нМ, с клетками MM.1R - 9,74 нМ, с клетками EJM - 17,5 нМ, с клетками LP1-22,3 нМ, а с клетками U-2932-7,92 нМ.

Пример 12. Анализ экспрессии ВСМА и связывания с ВСМВ72 ex vivo в цельной крови нормальных человеческих доноров.

Экспрессию ВСМА и связывание с ВСМВ72 на лейкоцитах оценивали ex vivo в цельной крови от трех нормальных человеческих доноров. Вкратце перед экспериментом свежую периферическую кровь

от нормальных человеческих доноров хранили в покрытых гепарином пробирках. Кровь пипетировали в 96-луночный планшет с U-образным дном аликвотами по 100 мкл. Антитела для окрашивания получали в виде маточной смеси, как указано в протоколе эксперимента. Маточную смесь добавляли непосредственно в кровь вместе с антителами к ВСМА или ВСМВ72. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре планшет с кровью центрифугировали при 1350 об/мин в течение 3 мин при 4°C. Надосадочную плазму отделяли, а осадок подвергали четырем последовательным циклам лизиса эритроцитов с 5-минутными инкубациями после каждой промывки. После завершения лизиса осадок один раз промывали PBS и впоследствии окрашивали в PBS красителем для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (1:200) и антител к IgG4, конъюгированных с PE (1:50) (только для лунок с ВСМВ72). Планшеты дополнительно инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем пробы промывали 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS с целью анализа на LSRFortessa. С каждой лунки собирали приблизительно 100 000 событий. Анализ выполняли в FlowJo 7.6.

Как показано на фиг. 7, у трех нормальных доноров не было выявлено экспрессии ВСМА на лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах или плазматоидных дендритных клетках. ВСМВ72 продемонстрировали связывание с Т-клетками CD3⁺ у всех трех доноров с различной интенсивностью у доноров. ВСМВ72 не связывались с каким-либо другим типом клеток, который исследовали в данном анализе.

Пример 13. Влияние ВСМВ72 на профиль цитокинов.

Профиль цитокинов в супернатанте из анализов опосредованного Т-клетками уничтожения оценивали с использованием ВСМВ72 и контрольных антител. Т-клетки и антитела наносили на планшет так же, как в анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности (см. пример 10). Через 48 ч инкубации собирали клеточные супернатанты и измеряли различные (10/30 Plex) цитокины с помощью твердофазного ИФА, основанного на MSD. Концентрации цитокинов выражали в пг/мл, а построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с использованием нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра). Значения EC₅₀ шести цитокинов из клеточной линии RPMI8226 с использованием Т-клеток шести доноров показаны на фиг. 13. Данные демонстрируют значительное высвобождение цитокинов в результате Т-клеточной активации. При использовании контрольных антител высвобождение цитокинов было низким/полностью отсутствовало (данные не показаны).

Пример 14. Функциональное сравнение продуцированных НЕК и СНО (временные и стабильные клеточные линии) ВСМВ72 в отношении Т-клеточной активации и опосредованного Т-клетками уничтожения клеток-мишеней.

Биспецифические антитела, продуцированные в различных клетках и в различных режимах экспрессии, могут иметь разную активность. Таким образом, оценивали эффективность *in vitro* ВСМВ72, продуцированных в клетках НЕК (временная экспрессия) или СНО (временная или стабильная экспрессия).

ВСМВ72 разводили до 800 мкг/мл в PBS. Как указано в каждом эксперименте, титрование выполняли, используя 3-кратные или 4-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. В последний столбец добавляли только PBS (контроль с несущей средой).

Клетки-мишени H929 культивировали в среде RPMI 1640 без антибиотиков, обогащенной GlutaMAX, FBS 10% и 25 mM HEPES (культуральная среда). На первые сутки (1 сутки) клетки подсчитывали и 10 миллионов клеток центрифугировали при 1350 об/мин в течение 3 мин и отделяли супернатанты. Краситель для оценки пролиферации CellTrace FCSE разводили в 18 мкл стерильного DMSO и 1 мкл раствора разводили в 10 мл стерильного PBS. Осадок, состоящий из клеток H929, повторно суспендировали в 1 мл разведенного CFSE и инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин, защитив от попадания прямого солнечного света. После инкубации 1 мл HI FBS добавляли к клеточной суспензии для блокировки избытка CFSE. Клетки дважды промывали в 1640 RPMI, используя FBS 10%. После разведения в 10 мл RPMI клетки подсчитывали, а жизнеспособность клеток фиксировали в протоколе. Клетки разводили до указанной концентрации и инкубировали при 37°C до применения.

Т-клетки от нормальных доноров размораживали при 37°C в водяной бане, после чего содержимое флакона переносили в конический флакон объемом 50 мл и разводили в 15 мл холодной культуральной среды. Впоследствии клетки центрифугировали при 1350 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Отделяли супернатанты, а клеточные осадки разводили в 5-10 мл культуральной среды. Т-клетки подсчитывали и разводили в культуральной среде до нужной концентрации (см. протокол каждого эксперимента).

В лунки добавляли клетки H929, а затем Т-клетки (соотношение эффектор:мишень 5:1). В данной серии исследований не использовали блокатор Fc. После смешивания мишеней с Т-клетками в каждую лунку добавляли 20 мкл разведенных ВСМВ72. Планшеты инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через 2 суток планшеты, содержащие клетки, центрифугировали, а супернатанты либо отделяли, либо помещали на хранение для анализа высвобождения цитокинов. Клетки промывали в 200 мкл PBS и инкубировали в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200) и антител к CD25, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (разведение 1:50), в течение 20 мин при комнатной температуре. Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного рас-

твор для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки оценивали путем проточной цитометрии на те же сутки с помощью FACSCanto II и анализировали, используя FlowJo 7.6 в отношении цитотоксичности для мишеней (% мишеней) и Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра) и метода наименьших квадратов.

Как видно на фиг. 14, ВСМВ72, продуцированные в клетках НЕК и продуцированные в клетках СНО, показывали практически идентичные результаты в анализе перенаправления Т-клеток в отношении цитотоксичности клеток-мишеней и стимуляции Т-клеток. По существу максимальная цитотоксичность составила 85%, а Т-клеточная активация 80%. Средние значения EC_{50} для цитотоксичности составляли 0,29 нМ для ВСМВ72, продуцированных в клетках НЕК, и 0,42-0,47 нМ для ВСМВ72, продуцированных в клетках СНО. Средние значения EC_{50} для Т-клеточной активации составляли 0,28 нМ для ВСМВ72, продуцированных в клетках НЕК, и 0,37-0,41 нМ для ВСМВ72, продуцированных в клетках СНО. Сравнительный анализ с использованием t-критерия Стьюдента продемонстрировали отсутствие статистически значимых различий между значениями EC_{50} .

Пример 15. Активация антителами ВСМВ72 сигнального пути P38.

Как BAFF, так и APRIL связываются с двумя рецепторами: ВСМА (антиген созревания В-клеток, TNFRSF 17) и TACI (трансмембранный активатор и партнер SAML, TNFRSF 13b). Взаимодействие с ВСМА активирует сигнальные пути JNK и P38 MAPK. Возможно, биспецифическое антитело к ВСМА×CD3, ВСМВ72, может оказывать агонистический эффект в отношении ВСМА. Данное исследование включало в себя две части. 1. Разработка анализа Simple Western для отслеживания изменений P38a MAPK в клетках H929 или MM1.R после обработки APRIL или BAFF. 2. Использование недавно разработанного анализа для проверки того, оказывает ли ВСМВ72 агонистический эффект в отношении ВСМА. Обработка клеток

Перед обработкой клетки H929 или MM1.R засеивали в концентрации 1,5е6/мл в бессывороточную среду RPMI на 24 ч при 37°C в присутствии 5% CO₂. На сутки обработки клетки осаждали путем центрифугирования и повторно суспендировали в бессывороточной RPMI в концентрации 1,5е6/мл. Для анализа временной динамики клетки добавляли в 10 пробирок по 5 мл в каждую. В каждую пробирку с клетками добавляли 1000 нг/мл APRIL (R&D Systems, номер по каталогу 5860-AP-010) или 1000 нг/мл BAFF (R&D Systems, номер по каталогу 2149-BF-010) на 0, 5, 15, 30 и 60 мин соответственно при 37°C в присутствии 5% CO₂. После инкубации клетки немедленно осаждали и замораживали при -80°C для получения клеточного лизата. Группы обработки клеток H929 в анализе агонистического эффекта ВСМВ72 перечислены в табл. 13. Анализ агонистического эффекта ВСМВ72 выполняли дважды.

Таблица 13

Группы обработки для анализа агонистического эффекта ВСМВ72

Проба	Обработка (15 мин)
1	APRIL 0 нг/мл
2	APRIL 1000 нг/мл
3	BAFF 0 нг/мл
4	BAFF 1000 нг/мл
5	ВСМВ72 0 нг/мл
6	ВСМВ72 10 нг/мл
7	ВСМВ72 100 нг/мл
8	ВСМВ72 1000 нг/мл
9	ВСМВ72 10000 нг/мл

Получение клеточного лизата для анализа Simple Western.

Клетки лизировали буферным раствором RIPA, содержащим ингибиторы фосфатазы и протеазы. Концентрацию белка измеряли на планшетном спектрофотометре SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, г. Саннивейл, штат Калифорния, США), используя набор BioRad DC Protein Assay (BioRad, № 500-0112) и стандарты бычьего сывороточного альбумина.

Анализ Simple Western.

Анализ Simple Western выполняли с использованием набора Wes-Rabbit (12-230 КДа) Master (ProteinSimple, № PS-MK01) в соответствии с руководством пользователя ProteinSimple. Вкратце пробы клеточного лизата смешивали с маточной смесью до достижения конечной концентрации буферного раствора для проб 1×, флуоресцентных меток молекулярной массы 1× и 40 мМ дитиотреитола (DTT), а впоследствии выдерживали при 95°C в течение 5 мин. Пробы, блокирующий реагент, первичные антитела phosphor-p38 MAPK (ThermoFisher: VWR № MA5-15182) или актин-бета (Cell Signaling, № 8457S), конъю-

югированные с пероксидазой хрена (HRP) вторичные антитела, хемиллюминесцентный субстрат и матрицы для разделения и укладки также дозировали в соответствующие лунки в микропланшетах Simple Wes. После загрузки планшета в капиллярной системе выполняли полностью автоматические стадии электрофоретического разделения и иммунодетекции. Во время электрофореза белки разделяли на основе молекулярной массы с помощью матриц для разделения и укладки и иммобилизовали на капиллярной стенке с использованием собственного анализа фотоактивированного захвата. Первичные антитела разводили в соотношении 1:50 разбавителем антител II (ProteinSimple № 042-203). Выполняли иммунозондирование целевых белков первичными антителами в течение 60 мин с последующим добавлением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Анализ Simon-simple Western выполняли при комнатной температуре, используя настройки прибора по умолчанию. Цифровое изображение анализировали с помощью программы Compass (ProteinSimple), а количественные данные об обнаруженном белке фиксировали в виде молекулярной массы, интенсивности сигнала/пика и площади пика.

Результаты.

На основании информации, полученной из исследования временной динамики, выполняли анализ агонистического эффекта ВСМВ72 с клетками H929, используя метод конечной точки с 15-минутной инкубацией. Сигналы p38 MAPK были нормализованы по сигналам человеческого бета-актина. На фиг. 15 показаны средние значения нормализованных сигналов p38 MAPK из двух анализов. Анализ агонистического эффекта ВСМВ72 продемонстрировал, что ВСМВ72 не оказывают агонистического влияния на ВСМА в клетках H929.

Пример 16. Иницирование сигнального пути NFκB посредством ВСМВ72.

ВСМА представляет собой поверхностный рецептор, который способен запускать сигнальный путь NF-κB в ответ на эндогенные лиганды. Влияние связывания ВСМВ72 с ВСМА на активацию пути NF-κB оценивали с использованием ВСМА-экспрессирующей репортерной клеточной линии, которая экспрессирует щелочную фосфатазу (SEAP) под действием промотора NFκB.

Клетки культивировали в среде DMEM, обогащенной GlutaMAX и 10% FBS (культуральная среда). Вечером перед экспериментом клетки собирали путем трипсинизации (5 мин в предварительно прогретом трипсине 0,25% при 37°C) и промывали в 30 мл культуральной среды. Впоследствии клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при 4°C и разводили в бессывороточной DMEM (содержащей GlutaMax) до концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл. 5×10^4 клеток добавляли в лунки 96-луночного плоскостного планшета и инкубировали при 37°C в течение 16 ч.

На следующее утро в соответствующие лунки (см. схемы экспериментального планшета) добавляли различные стимулирующие реагенты (TNFα, APRIL, ВСМВ72) и планшеты инкубировали при 37°C в течение дополнительных 16, 24 или 48 ч, при этом эти временные отметки соответствуют ранней, средней и поздней фазам передачи сигнала соответственно. При достижении каждой временной отметки из лунок извлекали 10 мкл кондиционированной культуральной среды, переносили их в 96-луночный цельный планшет, находящийся в наборе SEAP (Cayman, 600272), и накрывали крышкой. Стандарты SEAP получали путем разведения исходного стандарта (5 Ед/мл) в соотношении 1:10 в бессывороточной DMEM (содержащей GlutaMax) с последующим выполнением последовательных разведений 1:2; диапазон разведения составлял 50-0,78 мЕд/мл. Планшет с пробами инкубировали при 65°C в течение 30 мин для инактивации эндогенной щелочной фосфатазы; SEAP, экспрессируемая в данном анализе, является стабильной в этих условиях инкубации. После инкубации планшетов при комнатной температуре 10 мкл разведенного стандарта добавляли в соответствующие лунки. 50 мкл раствора субстрата добавляли во всех лунки и пробы недолго перемешивали для распределения раствора в лунках. Пробы инкубировали в течение 20-30 мин и оценивали хемиллюминесценцию, используя спектрофотометр PerkinElmer

Envision 2104 Multilabel Reader. Все результаты анализа люминесценции преобразовывали в концентрации, выраженные в единицах активности, на основании стандартной кривой, а значение анализировали в Microsoft Excel 2010 и импортировали в Graph Prism 6 для графического анализа.

На фиг. 16 показано, что хотя APRIL обладал способностью стимулировать ВСМА даже в концентрациях 0,46 нМ, в целом ВСМВ72 не активировал путь NF-κB в ВСМА-трансдуцированных клетках в концентрациях ниже 10 нМ. Умеренную ВСМВ72-зависимую активацию наблюдали при высоких (44-133 нМ) концентрациях ВСМВ72.

Пример 17. Влияние экзогенного добавления внеклеточного домена ВСМА на Т-клеточную активацию при отсутствии клеток-мишеней.

Внеклеточный домен (ECD) ВСМА способен формировать тримеры в растворе. Таким образом, существует возможность, что множественные биспецифические антитела могут связываться с тримерами ECD ВСМА и перекрестно соединяться с комплексами TCR при отсутствии клеток-мишеней. Это, в свою очередь, может способствовать активации Т-клеток независимым от мишени образом. В данном исследовании изучали, способен ли экзогенно добавленный ECD ВСМА запускать Т-клеточную активацию на уровне экспрессии CD25 без взаимодействия с клетками-мишенями.

ВСМВ72 (ВСМА×CD3) и контрольные антитела (нуль×CD3) разводили до 800 мкг/мл в PBS. Титрование выполняли, используя 3-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с

U-образным дном. В последний столбец добавляли только PBS (контроль с несущей средой).

Растворимый ECD BCMA (sBCMA) разводили до 36 мкг/мл (6,67 мкМ) в PBS. Титрование выполняли, используя 3-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. В верхней лунке оставляли только PBS (контроль с несущей средой).

Пан-Т-клетки от нормальных доноров размораживали при 37°C в водяной бане, после чего содержимое флаконов для заморозки переносили в конические флаконы объемом 50 мл и разводили в 30 мл холодной культуральной среды. Впоследствии клетки центрифугировали при 1350 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Отделяли супернатанты, а клеточные осадки разводили в 10 мл культуральной среды. Подсчитывали Т-клетки и фиксировали жизнеспособность. Впоследствии клетки разводили в культуральной среде до $0,525 \times 10^6$ /мл.

1×10^5 Т-клеток (190 мкл) добавляли в лунки с последующим добавлением 5 мкл разведенного sBCMA и 5 мкл разведенного BCMB72. Планшеты инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через двое суток планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин при 4°C и отделяли супернатанты. Клеточные осадки промывали в 200 мкл PBS и инкубировали в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200) и антител к CD25, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (разведение 1:50), в течение 20 мин при комнатной температуре. Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки анализировали с использованием FACSCanto II и FlowJo 7.6 в отношении Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с использованием нелинейной регрессии и метода наименьших квадратов.

Т-клетки от нормальных доноров не показывали опосредованной ECD sBCMA активации в присутствии BCMB72. Слабую активацию небольшого процента Т-клеток (10-15%) наблюдали при высоких концентрациях (>40 нМ) BCMB72 независимым от sBCMA образом (фиг. 17).

Пример 18. Влияние растворимого ECD BCMA, APRIL и BAFF на Т-клеточную активацию и BCMB72-зависимую цитотоксичность.

Растворимый ECD BCMA может выступать в роли приемника для антител к BCMA×CD3, а APRIL и BAFF могут быть конкурентными ингибиторами взаимодействия между поверхностным рецептором и антителами к BCMA×CD3. Влияние растворимого ECD BCMA и эндогенных лигандов APRIL и BAFF на цитотоксическую активность BCMB72-зависимого уничтожения клеток *in vitro* оценивали в анализах перенаправления Т-клеток с использованием иммортализованной клеточной линии H929 и пан-Т-клеток от нормального донора M7077.

BCMB72 разводили до 800 мкг/мл в PBS. Титрование выполняли, используя 3-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. В последний столбец добавляли только PBS (контроль с несущей средой). Растворимый ECD BCMA разводили до 9 мкг/мл, а APRIL и BAFF разводили до 10 мкг/мл. Титрование для обоих реагентов выполняли, используя 3-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном.

Клетки-мишени H929 культивировали в среде RPMI 1640 без антибиотиков, обогащенной GlutaMAX, FBS 10% и 25 mM HEPES (культуральная среда). На первые сутки (1 сутки) подсчитывали клетки-мишени и 10 миллионов клеток центрифугировали при 1350 об/мин в течение 3 мин, после чего отделяли супернатанты. Краситель для оценки пролиферации CellTrace FCSE разводили в 18 мкл стерильного DMSO и 1 мкл раствора разводили в 10 мл стерильного PBS. Клеточные осадки повторно суспендировали в 1 мл разведенного CFSE и инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин, защитив от попадания прямого солнечного света. После инкубации 1 мл HI FBS добавляли к клеточной суспензии для блокировки избытка CFSE. Клетки дважды промывали в RPMI-1640, используя FBS 10%. После разведения в 10 мл RPMI клетки подсчитывали, а жизнеспособность клеток фиксировали в протоколе. Клетки разводили до $2,2 \times 10^5$ /мл и инкубировали при 37°C до применения.

Пан-Т-клетки от нормального донора размораживали при 37°C в водяной бане, после чего содержимое флаконов для заморозки переносили в конические флаконы объемом 50 мл и разводили в 30 мл холодной культуральной среды. Впоследствии клетки центрифугировали при 1350 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Отделяли супернатанты, а клеточные осадки разводили в 10 мл культуральной среды. Подсчитывали Т-клетки и фиксировали жизнеспособность. Впоследствии клетки разводили в культуральной среде до $1,1 \times 10^6$ /мл.

2×10^5 Клеток H929 добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном; в данном исследовании не нужно было проводить инкубацию с блокатором Fc. В лунки добавляли 1×10^5 Т-клеток (соотношение эффектор:мишень 5:1). После смешивания мишеней с Т-клетками в лунки добавляли 20 мкл sBCMA, APRIL или BAFF с последующим добавлением 5 мкл разведенных антител. Планшеты инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через 2 суток планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин при 4°C и отделяли супернатанты. Клетки промывали в 200 мкл PBS и инкубировали в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200) и антител к CD25, конъюгированных с

фигоэритрином (PE) (разведение 1:50), в течение 20 мин при комнатной температуре. Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки анализировали с использованием FACSCanto II и FlowJo 7.6 в отношении цитотоксичности для мишеней (% мишеней) и Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра), используя метод наименьших квадратов.

BCMB72 обладали способностью инициировать цитотоксичность в клетках H929 в присутствии растворимого ECD BCMA, оказывая лишь небольшое воздействие (увеличение в 2 раза) на EC₅₀ в высоких дозах (>160 нМ) ECD sBCMA; влияние на Т-клеточную активацию было схожим (см. фиг. 18А и 18D). APRIL увеличивал значения EC₅₀ в отношении клеточной цитотоксичности и Т-клеточной активации в шесть раз в высоких дозах (46 нМ), при этом оказывая минимальное влияние на анализ в более низких дозах (см. фиг. 18В и 18Е). Значение максимального уничтожения клеток не изменялось под воздействием sBCMA или APRIL. Напротив, экзогенный BAFF не оказывал влияния на BCMB72-опосредованную цитотоксичность в концентрациях до 51 нМ (см. фиг. 18С). Потенциал Т-клеточной активации во всех случаях хорошо коррелировал с данными по цитотоксичности, как и ожидалось (см. фиг. 18F).

Пример 19. Конкуренция между BCMB72, APRIL и BAFF за связывание с BCMA *in vitro*.

Два лиганда TNF, APRIL и BAFF, способны связываться с BCMA и индуцировать каскад сигнализации, приводящий к выживанию и пролиферации клеток. Внеклеточный домен BCMA представляет собой короткий фрагмент из 54 аминокислот, который связывается с этими двумя лигандами, а также с антителами, вырабатываемыми против этого мотива. В настоящем примере оценивали конкуренцию этих лигандов в отношении BCMB72.

Анализ был основан на твердофазном ИФА. На стадии подготовки к конкурентному анализу BCMA-Fc метили MSD SulfoTag. Флакон объемом 50 мкг с BCMA-Fc разводили в 500 мкл PBS с получением раствора 0,1 мг/мл (3,125 мкМ мономер). 150 нмоль NHS-sulfoTag растворяли в 50 мкл воды с получением 3 мМ раствора. 5,2 мкл 3 мМ NHS-SulfoTag (15,6 нмоль) добавляли к 500 мкл BCMA-Fc (1,56 нмоль мономера) для проведения реакции мечения с избытком 10×. Реакционную смесь оставляли на 2 ч при комнатной температуре в темноте. 50 мкл 1 М Tris добавляли для гашения не вступившего в реакцию NHS. Избыток SulfoTag и Tris удаляли посредством замены буферного раствора в уравновешенной PBS центрифужной колонке 7k MWCO Zeba (2 мл). Конечный объем составлял ~630 мкл, таким образом, конечный комплекс SulfoTag-BCMA-Fc использовали в концентрации 2,5 мкМ.

Для конкурентного анализа антитела к BAFF (100 мкг) и к APRIL (100 мкг) разводили в 200 мкл PBS с получением стоковых растворов 0,5 мг/мл. По 30 мкл (6 мкг) каждого из антител к BAFF и к APRIL разводили в 2,97 мл PBS с получением растворов 2 мкг/мл. В каждую лунку 96-луночного планшета MSD с высокой степенью связывания добавляли 25 мкл раствора 2 мкг/мл антител к APRIL. В каждую лунку второго 96-луночного планшета MSD с высокой степенью связывания добавляли 25 мкл раствора 2 мкг/мл антител к BAFF. Планшеты хранили при 4°C в течение ночи для иммобилизации антител. Планшеты, покрытые антителами к BAFF и к APRIL, освобождали и добавляли 300 мкл/лунка SuperBlock. Через 1 ч блокировки при комнатной температуре планшеты 3 раза промывали PBS-T. По 10 мкг каждого из рекомбинантных APRIL и BAFF повторно суспендировали в 100 мкл PBS с получением растворов 0,1 мг/мл. По 3 мл растворов 2 мкг/мл APRIL и BAFF получали путем разведения 60 мкл свеже-разведенного белка в 2,94 мл SuperBlock. 25 мкл раствора 2 мкг/мл APRIL добавляли в каждую лунку планшета, покрытого антителами к APRIL, и 25 мкл раствора 2 мкг/мл BAFF добавляли в каждую лунку планшета, покрытого антителами к BAFF. Через 1 ч захвата при комнатной температуре планшеты 3 раза промывали PBS-T. 500 мкг антител к BCMA (R&D Sys Mab193) разводили в 1 мл PBS с получением стокового раствора 0,5 мг/мл (3,3 мкМ). Антитела к BCMA Mab193 (BCMB72.004) и контрольные антитела (нуль×CD3) разводили до 1 мкМ в SuperBlock. Трехкратные последовательные разведения 1 прт получали путем смешивания 100 мкл антитела в 200 мкл SuperBlock. 6 мл 30 нМ SulfoTag-BCMA-FC получали путем разведения 72 мкл вышеописанного белка в 5,928 мл SuperBlock. 25 мкл каждого антитела из стадии 11 добавляли в каждую лунку планшетов с захваченными APRIL/BAFF в соответствии со схемой ниже на фиг. 1. 25 мкл 30 нМ SulfoTag-BCMA-Fc добавляли в каждую лунку обоих планшетов. Через 1 ч при комнатной температуре планшеты 3 раза промывали PBS-T. В каждую лунку добавляли 150 мкл буферного раствора T MSD для считывания 1х и планшеты сканировали в Sector 6000 Imager. Эксперимент повторяли точно так же, как описано выше для получения второй независимой серии результатов.

Как видно на фиг. 19, инкубация с увеличивающимися количествами BCMB72, но не с контрольными антителами (нуль×CD3), предотвращала связывание белка BCMA-Fc с закрепленными на планшете APRIL и BAFF. Полученные результаты были аналогичными в двух независимых экспериментах, в каждом из которых использовали три повторения.

Пример 20. Связывание с BCMB72 и цитотоксичность CD138-положительных клеток костного мозга пациента с множественной миеломой.

Для оценки активности BCMB72 в первичных пробах от пациентов с множественной миеломой

данное антитело исследовали в анализе цитотоксического уничтожения с использованием замороженных проб костного мозга с множественной миеломой от 5 пациентов и Т-клеток здоровых доноров. Кроме того, измеряли связывание с антителами и потенциал Т-клеточной активации.

Анализ связывания с ВСМВ72.

100 мкл Клеточной суспензии разливали по всем лункам 96-луночного планшета с U-образным дном с последующим добавлением 95 мкл культуральной среды. Впоследствии в лунки добавляли 5 мкл последовательно разведенных ВСМВ72 и контрольных антител, а планшет инкубировали в течение 1 ч при 4°C. После окрашивания клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 мин и один раз промывали в 200 мкл PBS. Клетки центрифугировали еще один раз; отделяли супернатанты, после чего осадки разводили в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1: 200), антител к человеческому Fc IgG4, конъюгированных с PE (разведение 1:50), антител к CD138 (разведения MI15 1:50 и DL-101 1:50) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Впоследствии клетки центрифугировали и промывали в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Пробы анализировали, используя FACSCanto II и FlowJo 7.6, на интенсивность связывания с ВСМВ72 на CD138+ клетках костного мозга (MNC). Подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра), используя метод наименьших квадратов.

Анализ перенаправления Т-клеток 1×10^5 клеток-мишеней добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном с последующим добавлением 1×10^5 Т-клеток (примерное соотношение эффектор:мишень 5:1 при условии, что в мастоцитах костного мозга содержится в среднем 20% плазмоцитов). После смешивания мишеней с Т-клетками в каждую лунку добавляли 5 мкл разведенных ВСМВ72. Планшеты инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через двое суток планшеты центрифугировали и отделяли супернатанты. Клетки промывали в 200 мкл PBS и инкубировали в 50 мкл PBS с красителем для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200), антител к CD138 (разведения MI15 1:50 и DL-101 1:50), антител к TCR α/β (разведение 1:50) и антител к CD25, конъюгированных с PE (разведение 1:50) в течение 20 мин при комнатной температуре.

Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки анализировали с использованием FACSCanto II и FlowJo 7.6 в отношении цитотоксичности для плазмоцитов (% мертвых CD138+ клеток) и Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра), используя метод наименьших квадратов.

Результаты.

На фиг. 20 показано, что ВСМВ72 связывается и индуцирует уничтожение всех проб пациентов дозозависимым образом через 48 ч, как видно по исчезновению CD138+ плазмоцитов. Как и ожидалось, данные по Т-клеточной активации хорошо коррелируют с данными по уничтожению. Средняя EC₅₀ для Т-клеточной активации находилась в диапазоне 1 нМ. Эти данные подтверждают, что ВСМВ72 способны уничтожать первичные клетки множественной миеломы из костного мозга *in vitro*.

Пример 21. Противоопухолевая эффективность ВСМВ72 при предотвращении онкогенеза в ксенотрансплантатах человеческих клеток множественной миеломы H929 у PBMC-гуманизированных мышей NSG.

В исследовании оценивали эффективность ВСМВ72 в предотвращении онкогенеза в ксенотрансплантатах человеческих клеток множественной миеломы (MM) H929 у PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) гуманизированных мышей NSG (NOD SCID Gamma). Мышь NSG представляет собой линию мышей с иммунодефицитом, у которых отсутствуют зрелые функциональные Т-, В- и естественные киллерные (ЕК) клетки. Самкам мышей NSG определенной возрастной группы внутривенно вводили 1×10^7 PBMC человека на -7 сутки исследования. На 1 сутки после инокуляции PBMC каждой мыши подкожно (п/к) имплантировали человеческие клетки MM H929 (5×10^6 клеток в 200 мкл PBS) в заднюю правую дорсальную часть боковой поверхности тела с последующим внутривенным (в/в) введением каждому животному PBS и 0,1 мкг (0,005 мкг/кг), 0,5 мкг (0,025 мкг/кг) и 1 мкг (0,05 мкг/кг) ВСМВ72. Контрольный PBS и ВСМВ72 вводили через сутки или каждые трое суток. Общее число инъекций было равным пяти. Подкожные опухоли H929 можно было обнаружить в группах, по отношению к которым использовали PBS и 0,1 мкг ВСМВ72, уже на 8 сутки после имплантации опухолевых клеток. Опухоли из этих двух групп продолжали расти до достижения средних объемов опухоли $>500 \text{ мм}^3$ на 22 сутки. К 24 суткам средний объем опухоли в контрольной группе PBS превышал 1000 мм^3 . Интересно, что подкожные опухоли H929 не росли у мышей, по отношению к которым использовали 0,5 и 1 мкг ВСМВ72 (фиг. 21). Таким образом, ВСМВ72 ингибировали онкогенез ксенотрансплантатов человеческой MM H929 у всех животных, по отношению к которым использовали 0,5 и 1 мкг/животное.

Пример 22. Количественное определение растворимого ВСМА в сыворотке РВМС-гуманизированных мышей NSG с ксенотрансплантатами Н929 (клетки человеческой множественной миеломы), по отношению к которым использовали ВСМВ72.

Данное исследование было разработано с целью количественного определения концентраций растворимого ВСМА в сыворотке мышей с ксенотрансплантатом Н929 и выявления корреляции концентраций растворимого ВСМА с опухолевой нагрузкой у этих животных.

Вкратце сыворотку проб из исследования ксенотрансплантата анализировали посредством твердофазного иммуоферментного анализа (твердофазного ИФА) ВСМА, разработанного компанией R&D Systems. Сыворотку размораживали и разводили 1: 50 в разбавителе реагента и инкубировали в течение ночи при 4°С. Твердофазный ИФА ВСМА выполняли в соответствии с инструкцией изготовителя. Планшеты для твердофазного ИФА анализировали с помощью планшетного спектрофотометра MD SpectraMax M5 (Molecular Devices, г. Саннивейл, штат Калифорния), настроенного на 450 нм. Каждая лунка в планшете для твердофазного ИФА соответствует сыворотке от одной мыши в первоначальном исследовании ксенотрансплантата.

Наблюдали значительное снижение концентрации растворимого ВСМА в сыворотке мышей, по отношению к которым использовали 1 и 0,5 мкг ВСМА72, по сравнению с мышами, по отношению к которым использовали только PBS или ВСМВ72 в дозе 0,1 мкг/мышь (фиг. 22). Эти данные подтверждают исследование ксенотрансплантата, в котором у мышей, по отношению к которым использовали 1 и 0,5 мкг ВСМВ72, отсутствовал или наблюдался минимальный рост опухоли. Эти данные показывают, что растворимый ВСМА в пробах сыворотки может иметь значение в качестве потенциального биомаркера для оценки состояния множественной миеломы; мониторинг растворимого ВСМА может помочь отслеживать опухолевую нагрузку.

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность	
1	PRT	Человеческая	ВСМА	MLQ MAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCS SSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAIL WTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEP LKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRGDE IILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDS HCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSL PAALSATEIEKSISAR	
2	PRT	Мышиная	ВСМА	MAQQCFHSEYFDSLHACKPCHLRCSNP PATCQPYCDPSVTSSVKGTYTVLWIFLG LTLVLSLALFTISFLLRKMNPEALKDEP QSPGQLDGSQQLDKADTELTRIRAGDDR IFPRSLEYTVEECTCEDCVKSKPKGDS HFFPLPAMEEGATILVTTKTGDYKSSV PTALQSVGMKEKPTHTR	
3	PRT	Яванский макак	ВСМА	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCPKCQLRCS SSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMMNAILW TCLGLSLIISLAVFVLTFLLRKMSSEPL KDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRGDEI VLPRGLEYTVEECTCEDCIKKNPKVDS HCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNLSL AALSVTEIEKSISAR	
4	PRT	Человеческая	ВСМВ69, ВСМВ118, ВСМВ120, ВСМВ126, ВСМВ128 и ВСМВ129-HCDR1	ВСМВ117, ВСМВ119, ВСМВ125, ВСМВ127, ВСМВ176, ВСМВ180, ВСМВ181 и ВСМВ182-HCDR2	SGSYFWG
5	PRT	Человеческая	ВСМВ69, ВСМВ118, ВСМВ120, ВСМВ124, ВСМВ126, ВСМВ128, ВСМВ179, ВСМВ181 и ВСМВ182-HCDR2	ВСМВ117, ВСМВ119, ВСМВ123, ВСМВ125, ВСМВ127, ВСМВ176, ВСМВ180, ВСМВ181 и ВСМВ182-HCDR2	SIYYSGITYYNPSLKS

046105

6	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB117, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124 и BCMB129-HCDR3	HDGAVAGLFDY
7	PRT	Человеческая	BCMB121, BCMB122 и BCMB123 HCDR1	SSSYWG
8	PRT	Человеческая	BCMB121, BCMB122, BCMB129, BCMB130, BCMB131 и BCMB177-HCDR2	SIYYSGSTYYNPSLKS
9	PRT	Человеческая	BCMB118-HCDR3	HDAATAGLFDY
10	PRT	Человеческая	BCMB124, BCMB130 и BCMB131-HCDR1	SGSYWG
11	PRT	Человеческая	BCMB178, BCMB186, BCMB187 и BCMB188-HCDR2	SIYYSGWTYYNPSLKS
12	PRT	Человеческая	BCMB119-HCDR3	HEGATAGLFDY
13	PRT	Человеческая	BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 и BCMB188-HCDR1	SSSYFWG
14	PRT	Человеческая	BCMB183, BCMB184 и BCMB185-HCDR2	SIYYSGRTYYNPSLKS
15	PRT	Человеческая	BCMB120-HCDR3	HSGATAGLFDY
16	PRT	Человеческая	BCMB125 и BCMB131-HCDR3	HEGAVAGLFDY
17	PRT	Человеческая	BCMB126-HCDR3	HSGAVAGLFDY
18	PRT	Человеческая	BCMB127 и BCMB130-HCDR3	HDAAVAGLFDY
19	PRT	Человеческая	BCMB128, BCMB176, BCMB177 и BCMB178-HCDR3	HDGATAGLFDY
20	PRT	Человеческая	BCMB179, BCMB183 и BCMB186-HCDR3	HQGATAGLFDY
21	PRT	Человеческая	BCMB180, BCMB184 и BCMB187-HCDR3	HHGATAGLFDY
22	PRT	Человеческая	BCMB181-HCDR3	HWGATAGLFDY
23	PRT	Человеческая	BCMB182, BCMB185 и BCMB188-HCDR3	HYGATAGLFDY
24	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183,	GGNNIGSKSVH

046105

			BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 и BCMB188-LCDR1	
25	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 и BCMB188-LCDR2	DDSDRPS
26	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 и BCMB188-LCDR3	QVWDSSSDHVV
27	PRT	Человеческая	BCMB69-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSA
28	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125,	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQPPGQAPVVVVYDSDRPSG IPERFSGSNGNTATLTISRVEAGDEAV YYCQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVL

			BCMB126, BCMB128, BCMB130, BCMB177, BCMB179, BCMB181, BCMB183, BCMB185, BCMB187 и BCMB188-VL	BCMB127, BCMB129, BCMB131, BCMB178, BCMB180, BCMB182, BCMB184, BCMB186,	
29	PRT	Человеческая	BCMB118-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDAATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
30	PRT	Человеческая	BCMB121-VL		SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQKPGQAPVLVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
31	PRT	Человеческая	BCMB119-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHEGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
32	PRT	Человеческая	BCMB120-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHSGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
33	PRT	Человеческая	BCMB121 и BCMB122-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSA
34	PRT	Человеческая	BCMB123-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSA
35	PRT	Человеческая	BCMB124-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG

				QGLLVTVSSA
36	PRT	Человеческая	BCMB125-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHEGAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
37	PRT	Человеческая	BCMB126-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHSGAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
38	PRT	Человеческая	BCMB127-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
39	PRT	Человеческая	BCMB128-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGLLVTVSSA
40	PRT	Человеческая	BCMB129-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
41	PRT	Человеческая	BCMB130-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
42	PRT	Человеческая	BCMB131-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYYGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHEGAVAGLFDYWG QGLLVTVSSA
43	PRT	Человеческая	BCMB177-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GRYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGLLVTVSSA
44	PRT	Человеческая	BCMB178-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS

				ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GWTYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
45	PRT	Человеческая	BCMB179-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHQGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
46	PRT	Человеческая	BCMB180-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHHGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
47	PRT	Человеческая	BCMB181-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHWGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
48	PRT	Человеческая	BCMB182-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHYGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
49	PRT	Человеческая	BCMB183-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GRYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHQGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
50	PRT	Человеческая	BCMB184-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GRYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHHGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
51	PRT	Человеческая	BCMB185-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GRYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHYGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
52	PRT	Человеческая	BCMB186-VH	QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GWTYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL

				SSVTAADTAVYYCARHQGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
53	PRT	Человеческая	BCMB187-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GWYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHHGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
54	PRT	Человеческая	BCMB188-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GWYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHYGATAGLFDYWG QGTLVTVSSA
55	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь CD3B219	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV SKYGPCCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMSRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
56	PRT	Человеческая	Легкая цепь CD3B219	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGTCLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
57	PRT	Человеческая	BCMB117-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSA

58	PRT	Человеческая	BCMB176-VH		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGLVTVSSA
59	PRT	Человеческая	CD3B219-VH		TYAMN
60	PRT	Человеческая	CD3B219-VH		RIRSKYNNYATYYAASVKG
61	PRT	Человеческая	CD3B219-VH		HGNFGNSYVSWFAY
62	PRT	Человеческая	CD3B219-VL		RSSTGAVTTSNYAN
63	PRT	Человеческая	CD3B219-VL		GTNKRAP
64	PRT	Человеческая	CD3B219-VL		ALWYSNLWV
65	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь BCMB69		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSLGK
66	PRT	Человеческая	BCMB123, BCMB129, BCMB178, BCMB180, BCMB182, BCMB184, BCMB186, BCMB188 - легкая цепь	BCMB128, BCMB177, BCMB179, BCMB181, BCMB183, BCMB185, BCMB187 и	SYVLTQPPSVSVAPGQATARITCGGNIG SKSVHWYQQPPGQAPVVVYDSDRPSG IPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEAV YYCQVWDS SDHVVFVGGGKTLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
67	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь BCMB117		QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS

				<p>LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDRTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
68	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь ВСМБ123	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDRTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
69	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь ВСМБ128	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDRTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
70	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь ВСМБ129	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS</p>

				<p>ISSGSYFWGWIHQPPGKLEWIGSIYYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
71	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь ВСМБ176	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIHQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
72	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь ВСМБ177	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSSSYFWGWIHQPPGKLEWIGSIYYS GRYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT</p>

				VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
73	PRT	Искусственная	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK	
74	PRT	Человеческая	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
75	PRT	Человеческая	Fab	QLIQLESGLVLPKSETLSLTCTVSGGS ISSGSYFWGIRQPPGKLEWIGSIYYS GITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC HHHHHH	
76	PRT	Человеческая	BCMB69, BCMB118, BCMB120, BCMB124,	BCMB119, BCMB122, BCMB125,	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSG I PERFGSNGNTATLTI SRVEAGDEAV YYCQVWDS SSSDHVVFGGGTKLTVLGQPK
			BCMB126, BCMB130, легкая цепь	BCMB127, BCMB131	AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD - FYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с антигеном созревания В-клеток (BCMA), причем антитело имеет тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит

а) определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

б) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

в) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

г) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

д) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

е) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, а

указанная легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

2. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в которых переменный домен тяжелой цепи антитела (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

переменный домен тяжелой цепи антитела (в) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

переменный домен тяжелой цепи антитела (г) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; или

переменный домен тяжелой цепи антитела (д) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

3. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, в которых легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

4. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с BCMA, где антитело имеет тяжелую цепь и легкую цепь,

где указанная тяжелая цепь содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

где указанная легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

5. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с BCMA, где антитело имеет тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

6. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с внеклеточным доменом BCMA человека.

7. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

8. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент или одноцепочечное антитело.

9. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют взаимодействие BCMA и APRIL.

10. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, которые показывают IC₅₀ для взаимодействия BCMA и APRIL около 5,9 нМ при измерении посредством твердофазного ИФА.

11. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой IgG.

12. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет изотип IgG4.

13. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где IgG4 имеет замену S228P, замену L234A и замену L235A в области Fc.

14. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связываются с ВСМА человека и перекрестно реагируют с ВСМА яванского макака.

15. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой миеломы.

16. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

17. Рекомбинантная гибридная клетка, экспрессирующая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16.

18. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3, содержащие

а) первую тяжелую цепь (HC1);

б) вторую тяжелую цепь (HC2);

с) первую легкую цепь (LC1); и

д) вторую легкую цепь (LC2),

причем HC1 связана с LC1, а HC2 связана с LC2, и

при этом HC1 содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 59, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 60, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 61, а LC1 содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 63, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 64, с образованием первого антигенсвязывающего сайта, который иммуноспецифически связывается с CD3, и

при этом HC2 содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6, а LC2 содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 24, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 25, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 26, с образованием второго антигенсвязывающего сайта, который иммуноспецифически связывается с ВСМА.

19. Рекомбинантное биспецифическое антитело ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по п.18, где HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и где LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

20. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по п.18, содержащие HC1, содержащую SEQ ID NO: 55, LC1, содержащую SEQ ID NO: 56, HC2, содержащую SEQ ID NO: 65, и LC2, содержащую SEQ ID NO: 76.

21. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по п.18, где антитело или биспецифический фрагмент представляют собой IgG.

22. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-21, где антитело или биспецифический фрагмент имеют изотип IgG4.

23. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-22, где антитело или биспецифический связывающий фрагмент иммуноспецифически связываются с ВСМА человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере большей или равной 0,22 нМ по данным измерения методом поверхностного плазмонного резонанса.

24. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой миеломы.

25. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-24, где антитело или его биспецифический фрагмент связываются с ВСМА на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

26. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-25, где антитело или биспецифический фрагмент индуцируют активацию человеческой Т-клетки *in vitro* при EC₅₀ менее около 0,37 нМ.

27. Рекомбинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-25, где антитело или биспецифический фрагмент

индуцируют зависимую от Т-клеток цитотоксичность ВСМА-экспрессирующих клеток *in vitro* при EC_{50} менее около 0,45 нМ.

28. Рекombинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-27, где антитело или биспецифический фрагмент не влияют на активацию NF-κB при концентрациях ниже 10 нМ.

29. Рекombинантная клетка, экспрессирующая рекombинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28.

30. Рекombинантная клетка по п.29, которая представляет собой клетку гибридомы.

31. Способ лечения субъекта, пораженного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества рекombинантного биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его биспецифического антигенсвязывающего фрагмента к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28 нуждающемуся в таком лечении субъекту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

32. Способ ингибирования роста или пролиферации раковых клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества рекombинантного биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28 для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

33. Способ перенаправления Т-клетки к экспрессирующей ВСМА раковой клетке, включающий введение терапевтически эффективного количества рекombинантного биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28 для направления Т-клеток к раку.

34. Способ по п.31 или 33, в котором рак представляет собой гемобластоз.

35. Способ по п.34, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак, экспрессирующий ВСМА.

36. Способ по п.35, в котором В-клеточный рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому.

37. Способ по п.31, где способ дополнительно включает введение второго терапевтического агента, где второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.

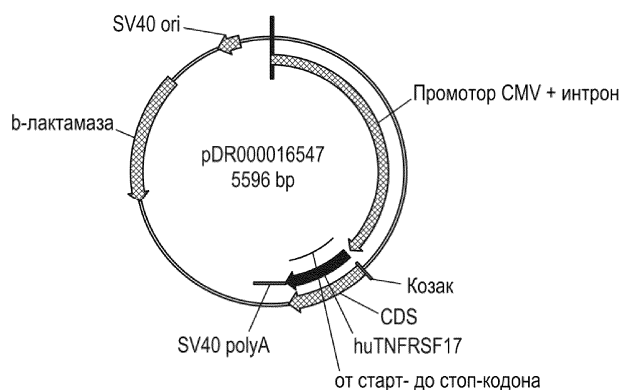
38. Способ по п.37, в котором химиотерапевтический препарат представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая рекombинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

40. Способ получения рекombинантного биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28, включающий культивирование клетки по п.29 или 30.

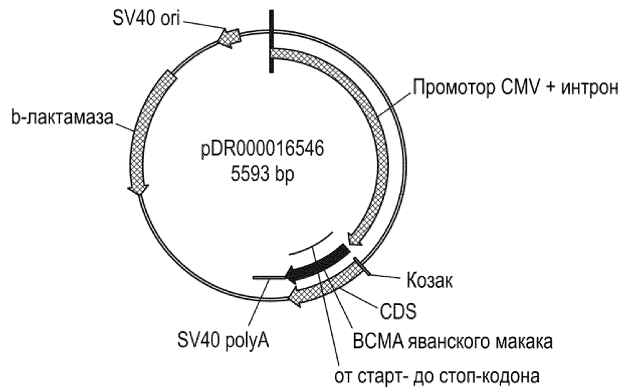
41. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 и LC2 рекombинантного биспецифического антитела к ВСМА×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28.

42. Набор для лечения рака, характеризующийся тем, что содержит рекombинантное биспецифическое антитело к ВСМА×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент к ВСМА×CD3 по любому из пп.18-28, выделенный синтетический полинуклеотид по п.41 и инструкцию для применения.

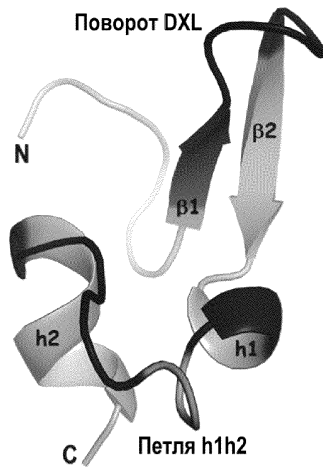


Фиг. 1А

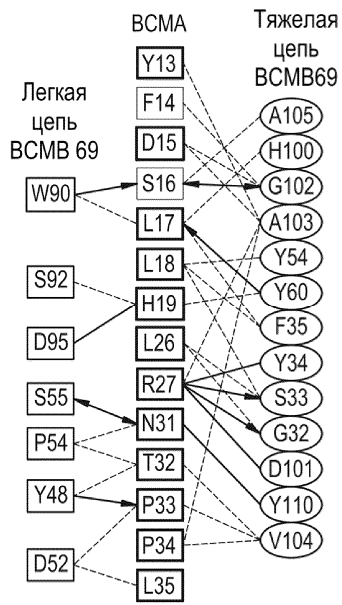
046105



Фиг. 1В

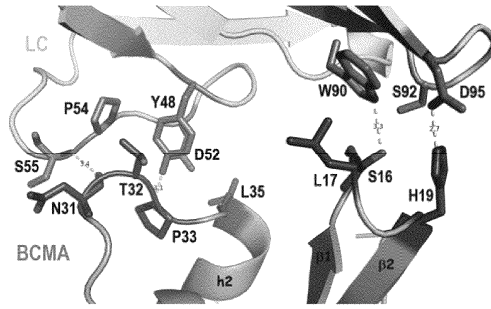


Фиг. 2А

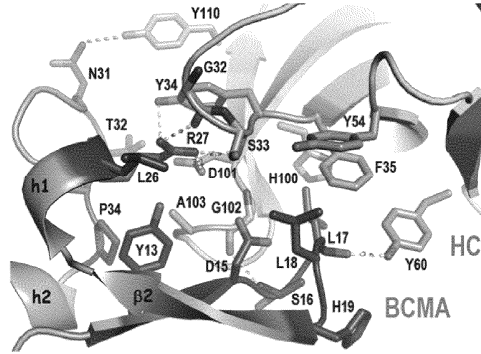


Фиг. 2В

046105



Фиг. 2С



Фиг. 2D

Эпитоп

	1		54	
BCMA человека	MLQ	MAGQCSQNEYFDSL	LHACIPCC	LRCCSSNTPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA (1-54 SEQ ID NO: 1)
BCMA яванского макака	MLQ	MARQCSQNEYFDSL	LDCPCQLRCCSS-TPLTCQRYCNASMTNSVKG	MNA (1-53 SEQ ID NO: 3)
BCMA мыши	--MA	QCQFHSYFDSL	LHACKPCHLRCCSN--P	PAATPCPYCDPSVTSVVKGTYT (1-49 SEQ ID NO: 2)

Паратоп

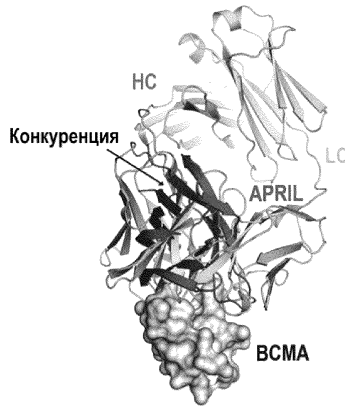
SEQ ID NO: 75

	1		CDR-H1		CDR-H2	77																																					
BCMB69_тяжелая цепь	QLQLQESG	PLV	KPSETLSL	CTVSGG	SISSGV	FWGVI	RQPPGKLEWIGS	LVY	SGIT	LVY	NP	SLKSRVTISVDTSK																															
	78		CDR-H3			154																																					
BCMB69_тяжелая цепь	NQFSLKL	SVTAAD	AVVY	CAR	HDGAV	AGL	FDV	MGQ	GLV	TVSS	AST	KGPSV	FLAP	SSK	STSGG	TAA	LGC	LV	KDY																								
	155					231																																					
BCMB69_тяжелая цепь	FPE	PVT	VSN	SGALT	SGV	HTF	PAV	LQSS	GLY	SL	SV	TV	VP	SS	SL	GT	Q	TYI	C	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	H	N	H	H	H

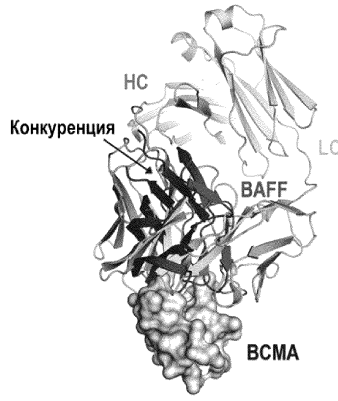
SEQ ID NO: 76

	1		CDR-L1		CDR-L2	72																																																											
BCMB69_легкая цепь	SYVLTQ	PPSV	SVAP	GQTARI	TCGG	NNIG	SKSV	HWY	Q	PP	G	AP	V	V	V	Y	DD	S	DR	ES	GI	P	E	R	F	S	G	S	N	G	N	T	A	T	L																														
	73		CDR-L3			144																																																											
BCMB69_легкая цепь	TISR	VEAG	DEAV	Y	CV	MD	SS	SH	V	F	G	G	T	K	L	T	V	L	G	P	K	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P															
	145					214																																																											
BCMB69_легкая цепь	AVT	V	A	W	K	G	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	R	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C

Фиг. 3



Фиг. 4А

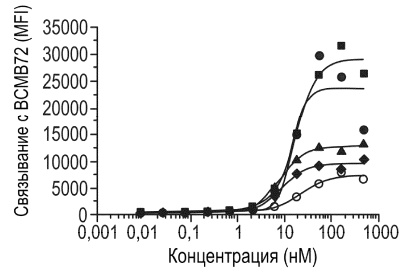


Фиг. 4В

mAb	Fc-VCMA	Первый комплекс		ДИАПАЗОН
		Конечный комплекс	Конечный комплекс	
		(K_{D1} , нМ)	(K_D , нМ)	
	Человек	1,59	0,18	0,15 – 0,20
VCMB72	Яванский макак	17,8	6,50	5,36 – 7,27
	Мышь	283	72,4	62,0 – 82,9

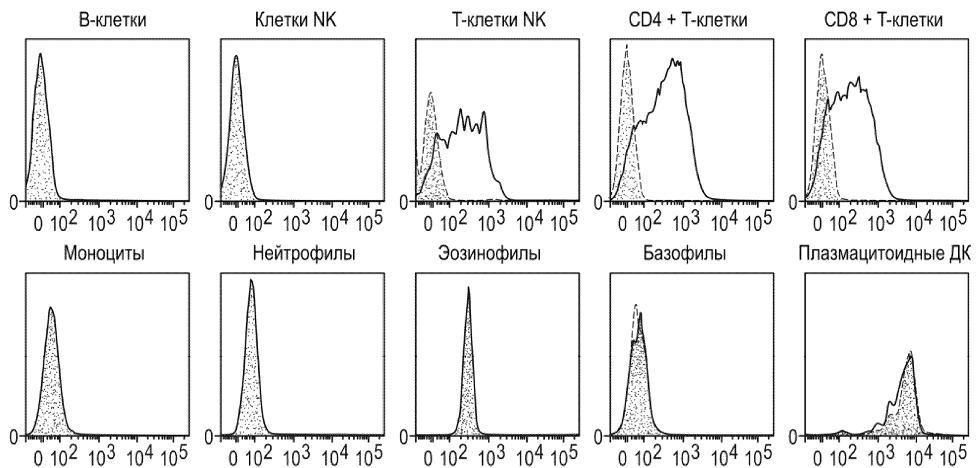
Аффинности VCMB72: человека > яванского макака >> мыши

Фиг. 5

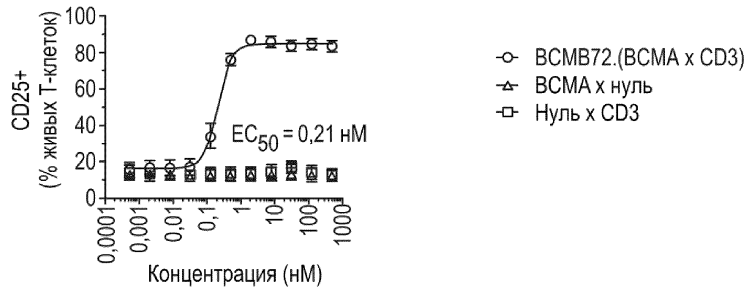


Клетки:	EC50 (нМ):
● H929	14,7
◆ MM.1R	8,74
■ EJM	17,5
○ LP1	22,3
▲ U2932	7,92

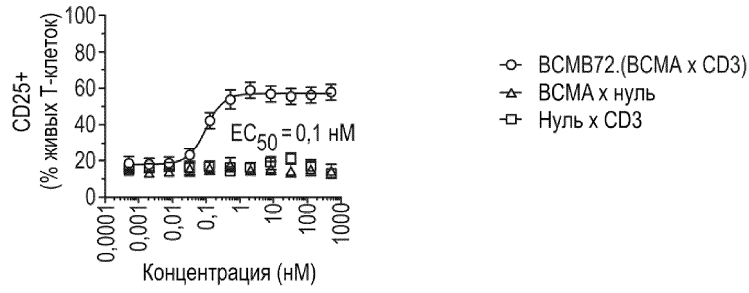
Фиг. 6



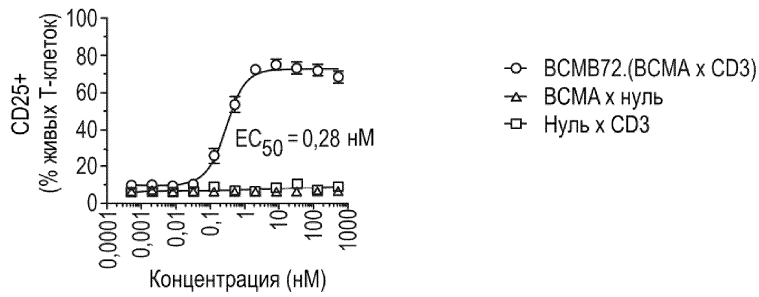
Фиг. 7



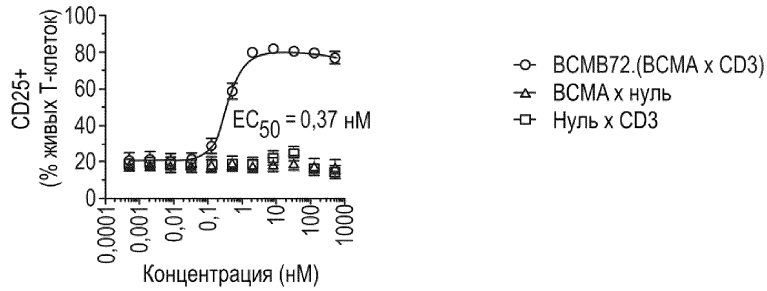
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С



Фиг. 8D



Фиг. 8Е

Клеточная линия	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
Донор	EC50 (нМ)	% макс. активации	EC50 (нМ)	% макс. активации
M5137	0,1683	89,74	~ 0,5477	68,70
M7197	0,3000	80,73	1,0860	81,11
M6576	0,3178	85,08	0,5134	82,66
M6457	0,2436	74,57	0,7859	81,07
M2550	0,1572	92,34	0,4325	85,24
M6521	0,1313	85,01	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	1,3240	72,96
Среднее	0,2116	84,64	0,7070	78,53

Клеточная линия	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
Донор	EC50 (нМ)	% макс. активации	EC50 (нМ)	% макс. активации
M5137	0,0968	64,71	0,1296	79,62
M7197	0,1159	45,60	0,1323	70,25
M6576	0,1179	50,93	0,1646	78,08
M6457	0,0776	49,27	0,1042	80,51
M2550	0,1206	60,05	0,3514	83,80
M6521	0,0964	73,62	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	0,2470	66,68
Среднее	0,0992	57,12	0,1675	76,25

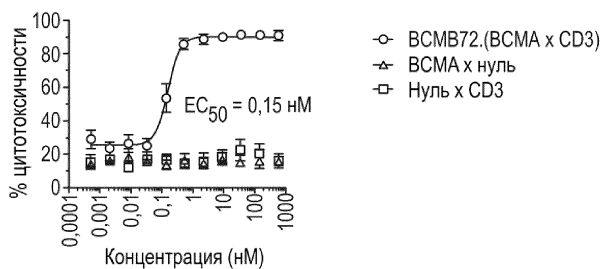
Клеточная линия	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
Донор	EC50 (нМ)	% макс. активации	EC50 (нМ)	% макс. активации
M5137	0,2448	71,81	0,4787	50,33
M7197	0,2260	67,98	0,3357	64,15
M6576	0,2482	77,69	0,3094	70,58
M6457	0,3041	66,83	0,4631	57,15
M2550	0,6072	84,07	0,5163	70,42
M6521	0,1409	67,74	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	0,4055	54,73
Среднее	0,2777	72,76	0,4024	61,19

Фиг. 9А

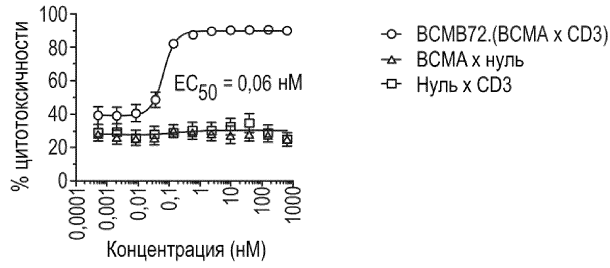
Клеточная линия	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
Донор	EC50 (нМ)	% макс. активации	EC50 (нМ)	% макс. активации
M5137	0,2068	85,39	0,4073	73,02
M7197	0,3833	71,98	0,5545	65,98
M6576	0,4521	80,52	0,6042	76,95
M6457	0,3646	74,82	0,4772	61,85
M2550	0,5256	85,30	0,6823	76,24
M6521	0,4068	84,71	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	0,6629	68,31
Среднее	0,3743	80,41	0,5711	70,34

Клеточная линия	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
Донор	EC50 (нМ)	% макс. активации	EC50 (нМ)	% макс. активации
M5137	~ 2,940e+006	~ 1522	~ 1,357	4,702
M7197	6,214	7,572	144	6,156
M6576	~ 1,855e+010	~ 104868	31,41	10,7
M6457	~ 2,294e+007	~ 4196	нет подгонки	нет подгонки
M2550	~ 4,075e+008	~ 68789	16,85	5,626
M6521	~ 59722	~ 110,5	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	279	8,427
Среднее	1,531E+12	229246	30,58	6,958

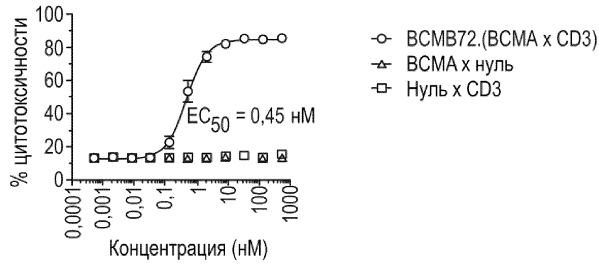
Фиг. 9В



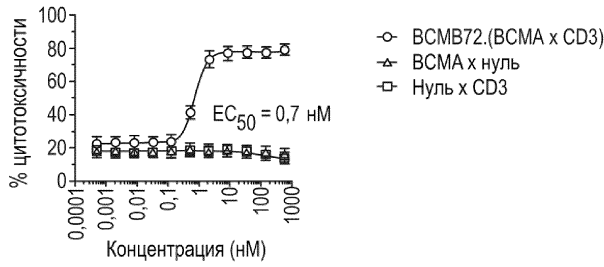
Фиг. 10А



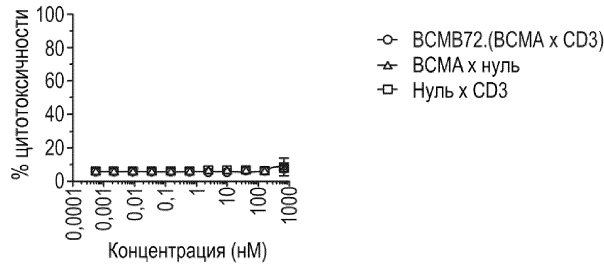
Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 10D



Фиг. 10E

046105

Клеточная линия	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
	EC50 (нМ)	% макс. лизиса	EC50 (нМ)	% макс. лизиса
M5137	0,2376	90,48	1,1630	75,61
M7197	0,1631	92,02	1,3480	82,56
M6576	~ 0,1405	91,75	0,4301	87,14
M6457	0,2294	79,98	0,8720	82,29
M2550	~ 0,1130	92,48	0,3575	89,63
M6521	0,0973	92,27	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	1,7690	80,05
Среднее	0,1495	89,72	0,8133	83,13

Клеточная линия	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
	EC50 (нМ)	% макс. лизиса	EC50 (нМ)	% макс. лизиса
M5137	0,0654	92,97	0,0569	97,23
M7197	0,0824	92,60	0,0945	96,75
M6576	0,0480	90,47	0,0617	95,29
M6457	0,0548	81,00	0,0432	87,92
M2550	0,0595	92,95	0,1212	96,97
M6521	0,0511	87,76	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	0,1008	94,98
Среднее	0,0617	89,62	0,0766	94,87

Клеточная линия	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
	EC50 (нМ)	% макс. лизиса	EC50 (нМ)	% макс. лизиса
M5137	0,5044	82,02	1,0670	81,12
M7197	0,7262	82,47	0,8636	78,55
M6576	0,3366	86,65	0,4842	79,81
M6457	0,6967	76,10	1,0700	69,25
M2550	0,5379	89,73	0,6956	84,73
M6521	0,1625	81,03	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	1,2050	73,50
Среднее	0,4531	83,55	0,8543	77,99

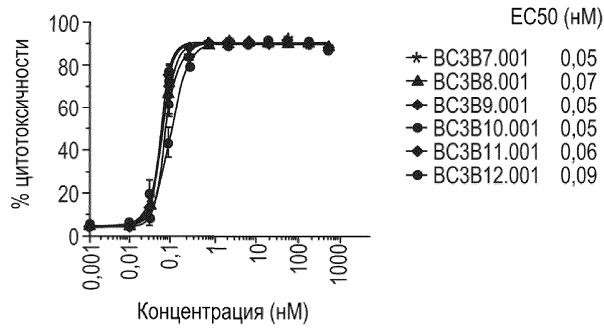
Фиг. 11А

Клеточная линия	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
	EC50 (нМ)	% макс. лизиса	EC50 (нМ)	% макс. лизиса
M5137	0,7610	72,59	1,0180	76,19
M7197	0,7355	76,36	1,1610	77,29
M6576	0,7298	83,86	0,9710	82,34
M6457	0,7734	62,05	1,4320	56,77
M2550	0,6516	83,21	0,9347	85,93
M6521	0,5621	83,09	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	1,1580	74,21
Среднее	0,7046	76,82	1,0800	75,31

Клеточная линия	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
	EC50 (нМ)	% макс. лизиса	EC50 (нМ)	% макс. лизиса
M5137	2,038	8,425	~ 0,06555	18,31
M7197	~ 157,1	4,79	no fit	no fit
M6576	~ 391461	~ 23049	18,61	9,836
M6457	no fit	no fit	0	-9780
M2550	~ 147,7	8,21	~ 14,70	8,366
M6521	нет подгонки	нет подгонки	нет данных	нет данных
M7077	нет данных	нет данных	~ 1,247e+022	18,68
Среднее	~ 157,2	7,658	нет подгонки	нет подгонки

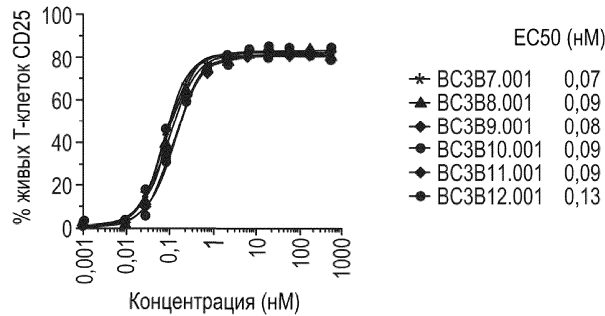
Фиг. 11В

Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности клетки Н929 (48 ч). Идентификатор донора: М 5763 и 6576



Фиг. 12А

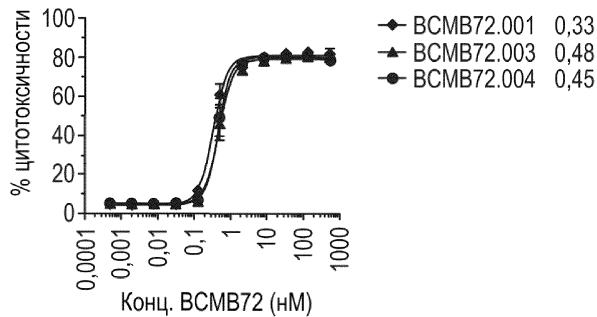
Анализ активации Т-клеток клетки Н929 (48 ч). Идентификатор донора: М 5763 и 6576



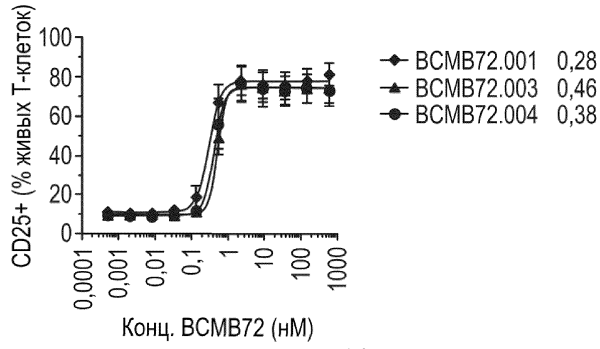
Фиг. 12В

Анализ EC ₅₀ ВСМА x CD3 (нМ)						
	M2550	M5137	M6457	M6541	M6576	M7197
IFNγ	2,049	~ 2,079	~ 2,112	~ 0,9252	1,366	1,126
TNFα	2,909	2,377	3,717	2,863	1,991	95,15
IL-2	3,262	1,645	2,508	1,297	1,501	1,767
IL-6	2,385	~ 2,054	1,65	~ 0,5650	0,7961	~ 0,5003
IL-8	1,031	0,3267	0,7208	~ 0,1117	0,328	~ 0,4640
IL-10	1,158	~ 0,7865	0,7296	~ 0,5154	~ 0,5217	0,9593

Фиг. 13

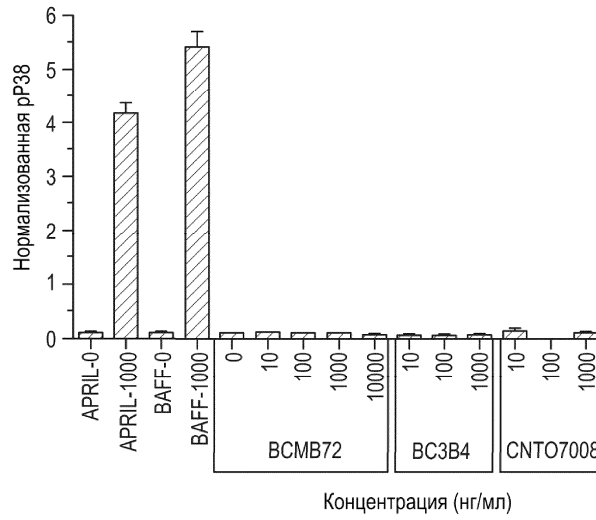


Фиг. 14А

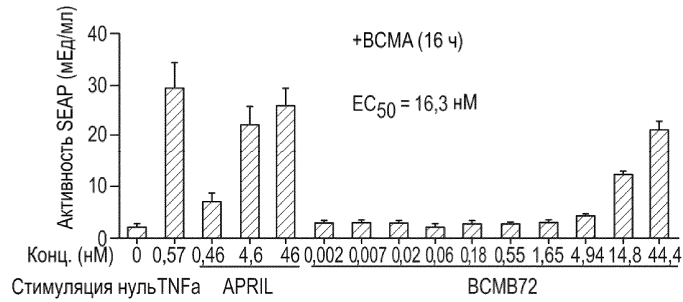


Фиг. 14В

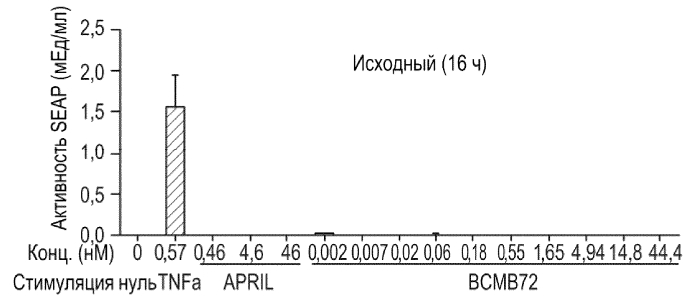
Активация Р38 в клетках Н929



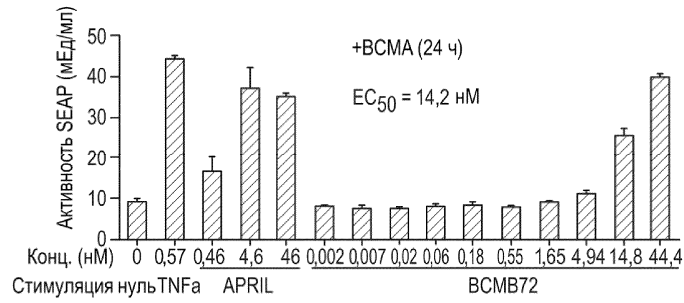
Фиг. 15



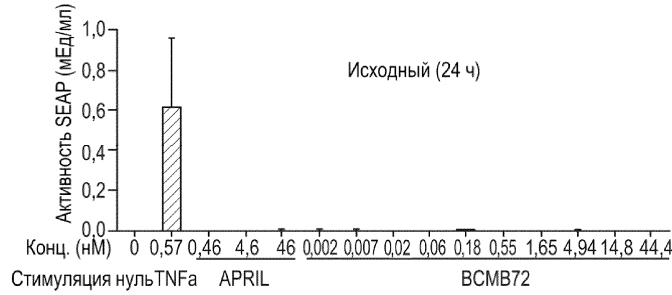
Фиг. 16А



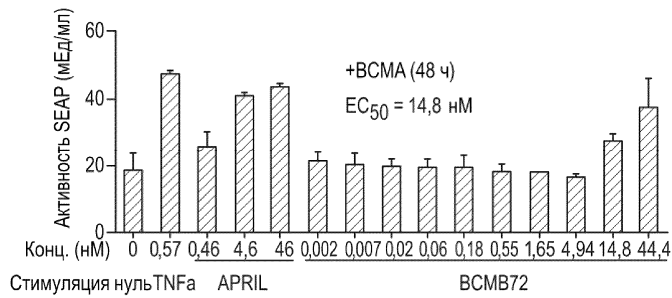
Фиг. 16В



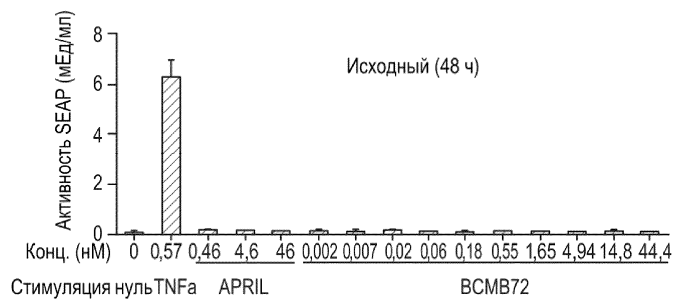
Фиг. 16С



Фиг. 16D

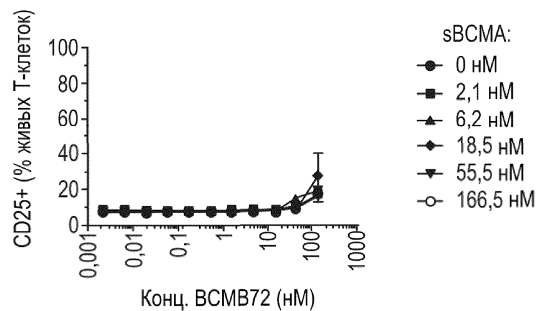


Фиг. 16E



Фиг. 16F

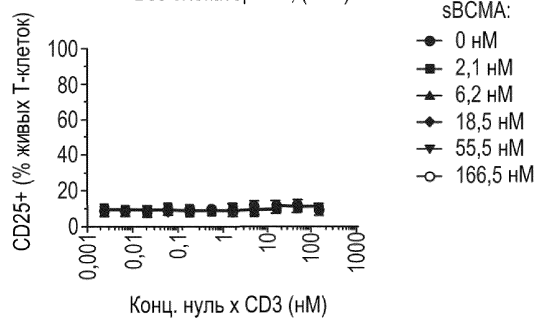
VCMB72 Т-клетки: М7077 и М5137
Без блокатора Fc, (48 ч)



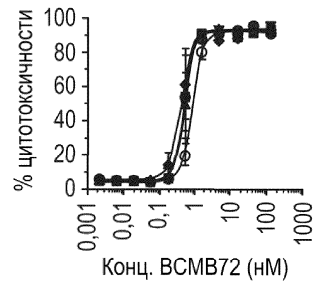
Фиг. 17А

046105

Нуль x CD3; Т-клетки: М7077 и М5137
Без блокатора Fc, (48 ч)



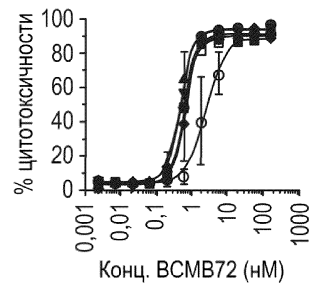
Фиг. 17В



sBCMA: EC₅₀ (нМ):

● 0 нМ	0,44
■ 2,1 нМ	0,51
▲ 6,2 нМ	0,50
◆ 18,5 нМ	0,50
▼ 55,5 нМ	0,55
○ 166,5 нМ	0,89

Фиг. 18А

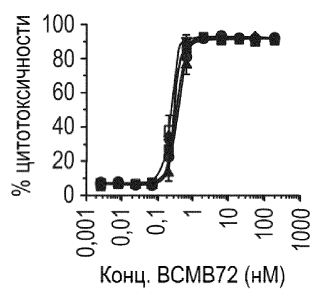


APRIL: EC₅₀ (нМ):

● 0 нМ	0,42
■ 0,2 нМ	0,56
▲ 0,6 нМ	0,54
◆ 1,7 нМ	0,52
▼ 5,1 нМ	0,54
□ 15,4 нМ	0,63
○ 46,1 нМ	2,30

Фиг. 18В

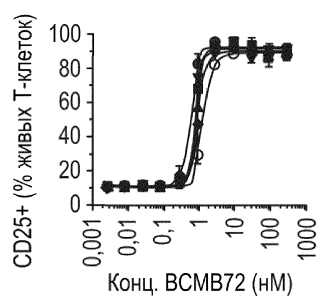
046105



BAFF: EC₅₀ (нМ):

● 0 нМ	0,23
■ 0,2 нМ	0,29
▲ 0,6 нМ	0,25
◆ 1,9 нМ	0,30
▼ 5,7 нМ	0,30
□ 17 нМ	0,35
○ 51 нМ	0,23

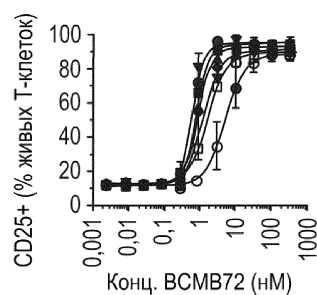
Фиг. 18С



sВСМА: EC₅₀ (нМ)

● 0 нМ	0,42
■ 2,1 нМ	0,52
▲ 6,2 нМ	0,54
◆ 18,5 нМ	0,51
▼ 55,5 нМ	0,58
○ 166,5 нМ	0,80

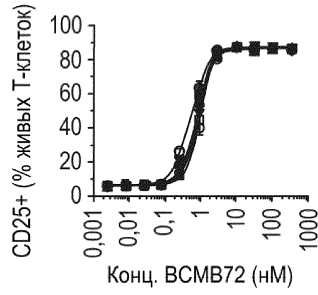
Фиг. 18D



APRIL: EC₅₀ (нМ)

● 0 нМ	0,40
■ 0,2 нМ	0,51
▲ 0,6 нМ	0,49
◆ 1,7 нМ	0,59
▼ 5,1 нМ	0,70
□ 15,4 нМ	0,96
○ 46,1 нМ	2,73

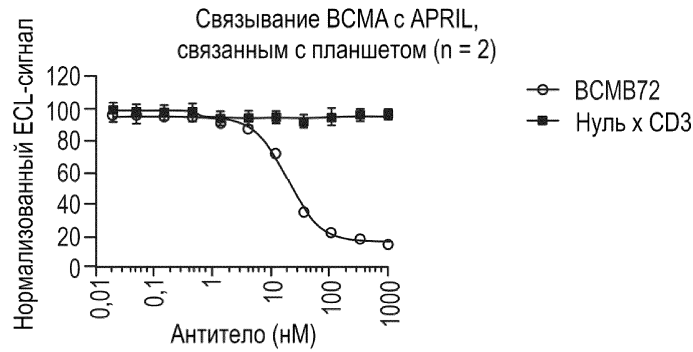
Фиг. 18E



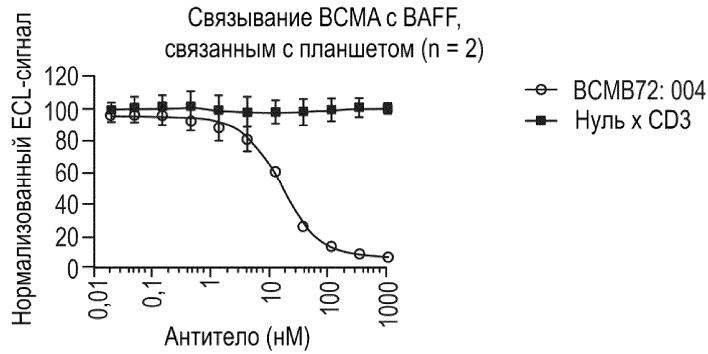
BAFF: EC₅₀ (нМ)

● 0 нМ	0,37
■ 0,2 нМ	0,50
▲ 0,6 нМ	0,44
◆ 1,9 нМ	0,48
▼ 5,7 нМ	0,53
□ 17 нМ	0,62
○ 51 нМ	0,33

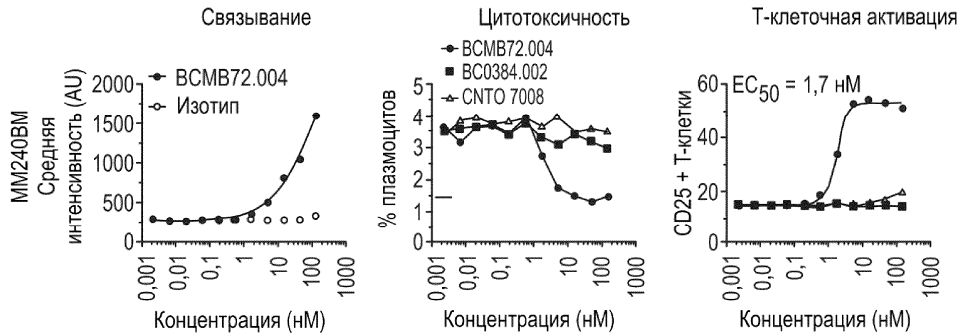
Фиг. 18F



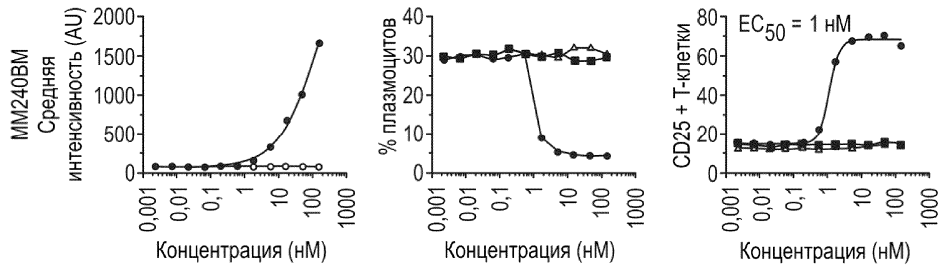
Фиг. 19А



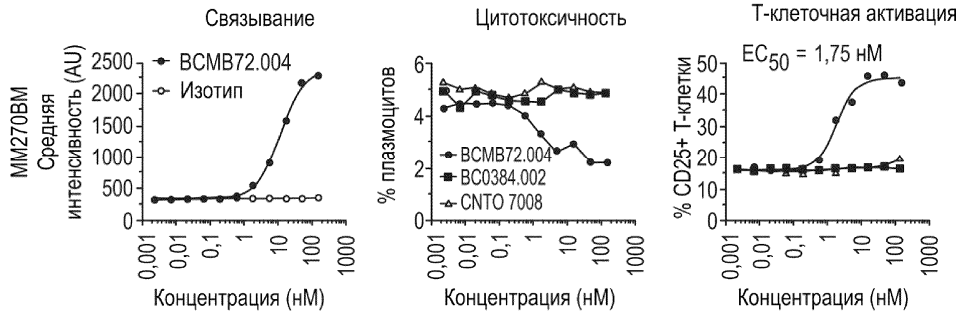
Фиг. 19В



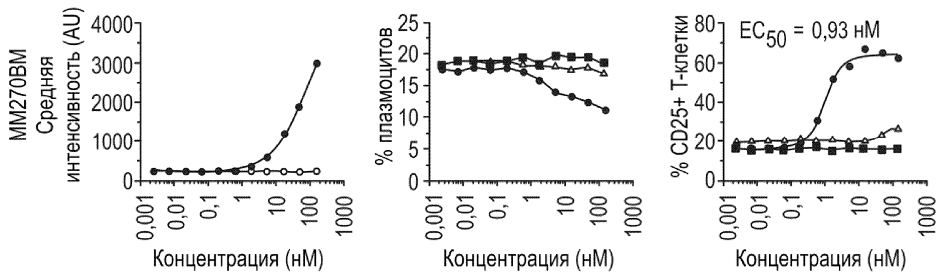
Фиг. 20А



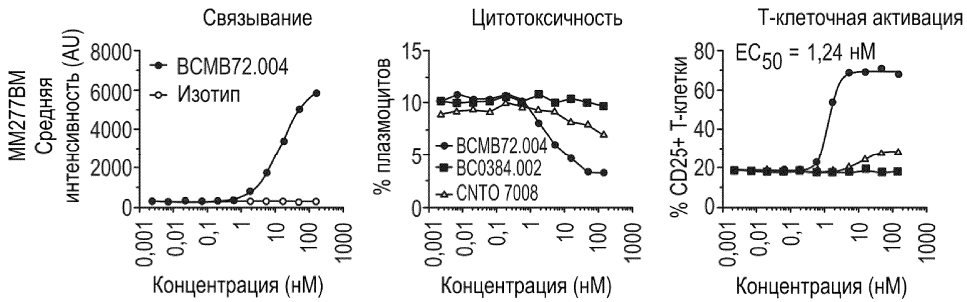
Фиг. 20В



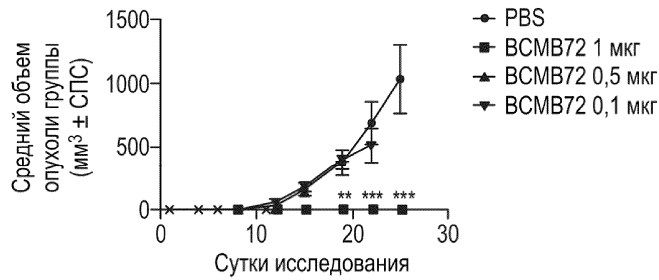
Фиг. 20С



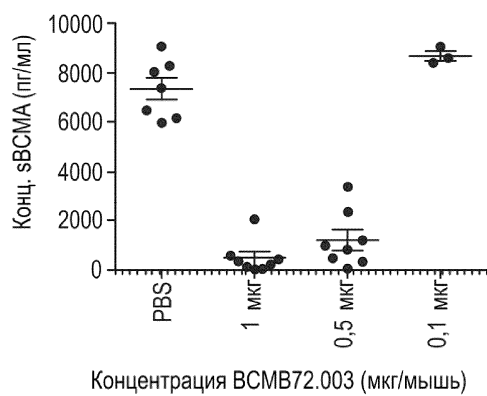
Фиг. 20D



Фиг. 20Е



Фиг. 21



Фиг. 22

