

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046403**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.08**

(21) Номер заявки  
**202090323**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.07.31**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **КОНЪЮГАТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ВСМА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

---

(31) **62/539,825; 62/596,194**

(32) **2017.08.01; 2017.12.08**

(33) **US**

(43) **2020.09.17**

(86) **PCT/IB2018/055753**

(87) **WO 2019/025983 2019.02.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**МЕДИММЬОН, ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:  
**Киннир Криста, Варки Рина, Сяо  
Сяодун, Херт Элейн М., Тайс Дэвид  
(US)**

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

(56) **WO-A1-2016166629  
WO-A2-2014089335  
WO-A1-2012163805  
WO-A2-2010104949**

**RYAN MAUREEN C. ET AL.: "Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 6, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 3009-3018, XP002581270, ISSN: 1535-7163, the whole document**  
**COHEN ADAM D. ET AL.: "First in Human Study with GSK2857916, an Antibody Drug Conjugated to Microtubule-Disrupting Agent Directed Against B-Cell Maturation Antigen (BCMA) in**

**Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM): Results from Study BMA117159 Part 1 Dose Escalation", BLOOD, vol. 128, no. 22, 1148, 2 December 2016 (2016-12-02), XP002785836, & 58TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 03-06, 2016, ISSN: 0006-4971, the whole document**  
**WO-A1-2013154760**

**KINNEER KRISTA ET AL.: "Preclinical Evaluation of MEDI2228, a BCMA-Targeting Pyrrolbenzodiazepine-Linked Antibody Drug Conjugate for the Treatment of Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 130, no. Suppl. 1, 3153, 7 December 2017 (2017-12-07), XP002785837, & 59TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 09-12, 2017, the whole document**

**KO JONATHAN ET AL.: "Preclinical Evaluation of Hdp-101, a Novel Anti-BCMA Antibody-Drug Conjugate, in Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 130, no. Suppl. 1, 3070, 7 December 2017 (2017-12-07), XP002785838, & 59TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 09-12, 2017, ISSN: 0006-4971, the whole document**

**Medimmune LCC: "MEDI2228 in Subjects With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MEDI2228), NCT03489525", ClinicalTrials.gov 5 April 2018 (2018-04-05), XP002785840, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03489525?cond=medi2228&rank=1 [retrieved on 2018-10-18], the whole document**

(57) Настоящее изобретение направлено на конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные с цитотоксином. В настоящем изобретении также предусмотрены композиции, содержащие конъюгат антитела и лекарственного средства, и способы уничтожения клеток множественной миеломы (включая стволовые клетки множественной миеломы), которые экспрессируют BCMA, путем приведения в контакт клеток множественной миеломы с ADC.

---

**B1****046403****046403 B1**

В данный документ включен посредством ссылки во всей своей полноте машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный одновременно с настоящей заявкой и определенный следующим образом: (текстовый) файл ASCII размером 16498 байт под названием "BCMA-100-WO-PCT-SeqListing.TXT", созданный 31 июля 2018 г.

#### Уровень техники

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественное новообразование, характеризующееся накоплением клональных плазматических клеток (см., например, Palumbo et al., *New England J. Med.*, 364(11): 1046-1060 (2011), и Lonial et al., *Clinical Cancer Res.*, 77(6): 1264-1277 (2011)). Современные средства терапии для ММ включают химиотерапию, облучение, хирургическое вмешательство, биофосфонаты и трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT). Хотя эти средства терапии часто вызывают ремиссию, почти все пациенты в конечном итоге переносят рецидив и умирают (см., например, Lonial et al., выше, и Rajkumar, *Nature Rev. Clinical Oncol.*, 5(8): 479-491 (2011)).

Антиген созревания В-клеток (BCMA) является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), экспрессируемым на клетках В-клеточной линии (Laabi et al., *Nucleic Acids Research*, 22(7): 1147-1154 (1994)). Экспрессия BCMA наиболее высокая на терминально дифференцированных В-клетках. BCMA вовлечен в опосредование выживания плазматических клеток для поддержания долговременного гуморального иммунитета. Экспрессия BCMA была связана с рядом видов рака, аутоиммунных расстройств и инфекционных заболеваний. РНК BCMA была обнаружена повсеместно в клетках множественной миеломы, а белок BCMA был обнаружен на поверхности плазматических клеток у пациентов с множественной миеломой несколькими исследователями (см., например, Novak et al., *Blood*, 103(2): 689-694 (2004); Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909 (2007); Bellucci et al., *Blood*, 105(10): 3945-3950 (2005); и Moreaux et al., *Blood*, 703(8): 3148-3157 (2004)). Таким образом, BCMA был исследован в качестве возможной терапевтической мишени в случае множественной миеломы.

По-прежнему существует потребность в композициях, которые можно применять согласно способам лечения множественной миеломы. Данное изобретение предусматривает такие композиции и способы.

#### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрен конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные с цитотоксином. Моноклональное антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 6.

Кроме того, в настоящем изобретении рассмотрены композиции, содержащие вышеуказанный конъюгат антитела и лекарственного средства, и способы уничтожения клеток множественной миеломы (включая стволовые клетки множественной миеломы), которые экспрессируют BCMA, путем приведения в контакт клеток множественной миеломы с ADC.

В настоящем изобретении также предусмотрены моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против BCMA, которые содержат (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 6.

#### Краткое описание нескольких изображений графического(их) материала(ов)

На фиг. 1 представлен ряд графиков (фиг. 1A-1C), иллюстрирующих FACS-анализ связывания очищенных антител с адгезивными клетками 293 (Ad293), экспрессирующими huBCMA, cynoBCMA, BAFF-R и TACI, как описано в примере 1. Моноклональное антитело 15B2GL представляло собой единственное протестированное перекрестно реагирующее антитело в отношении макака-крабоеда, которое не связывалось с BAFF-R и/или TACI.

На фиг. 2 представлены графики, иллюстрирующие способность конъюгатов антитела к BCMA-лекарственное средство уничтожать клетки множественной миеломы (ММ) и плазмноклеточного лейкоза (PCL) *in vitro*, как описано в примере 4. На фиг. 2A-2H показана жизнеспособность специфических клеточных линий множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза, экспрессирующих BCMA, обработанных указанными ADC, в то время как на фиг. 2I и 2J изображена жизнеспособность клеточных линий, которые не экспрессируют BCMA.

Фиг. 3 включает графики, иллюстрирующие уничтожение клеточных линий множественной мие-

ломы в присутствии растворимого BCMA с помощью конъюгата антитело-лекарственное средство 15B2GL-SG3249 по сравнению с ADC I09-SG3249 в кондиционированных средах, собранных из клеток Ad293, экспрессирующих BCMA человека (фиг. 3A), или по сравнению с ADC J6M0-mc-MMAF и J6M0-SG3249 в кондиционированных средах, собранных из клеток Ad293, экспрессирующих BCMA человека (фиг. 3B), как описано в примере 4.

На фиг. 4 представлен график, иллюстрирующий изменение опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели множественной миеломы H929 в ответ на обработку с помощью нацеливающихся на BCMA ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 и J6M0-mc-MMAF по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 5 представлен график, иллюстрирующий изменение опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели множественной миеломы JJN3 в ответ на обработку ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, J6M0-mc-MMAF и IgG1 изотипического контроля-SG3249 по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 6 представлен график, иллюстрирующий изменение опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели плазмноклеточного лейкоза MM.1S в ответ на обработку ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 и J6M0-mc-MMAF по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 7 представлен график, иллюстрирующий изменение опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели плазмноклеточного лейкоза MM.1R в ответ на обработку ADC 15B2GL-SG3249 и J6M0-mc-MMAF по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 8 представлен ряд графиков и графических изображений проточной цитометрии, на которых проиллюстрирована экспрессия BCMA на стволовых клетках MM. Экспрессию BCMA обнаружили как на плазматических клетках MM (CD19-CD138+, серая осциллограмма), так и на стволовых клетках MM (CD19+CD138-, черная осциллограмма).

Фиг. 9 включает ряд графиков, иллюстрирующих чувствительность стволовых клеток MM в образцах пациентов MM263 (фиг. 9A), MM276 (фиг. 9B), MM277 (фиг. 9C) и MM284 (фиг. 9D) в отношении ADC 15B2GL-SG3249 по сравнению с ADC J6M0-mc-MMAF в анализе клоногенности. Контроли включают необработанные клетки и неспецифический конъюгат IgG1-SG3249 при самой высокой дозе 400 нг на мл. Количество образованных колоний нормализовали по отношению к количеству, образованному в необработанной культуре, которое установили в качестве 100%.

На фиг. 10 представлены графики, иллюстрирующие способность конъюгата антитело к BCMA-лекарственное средство уничтожать клетки множественной миеломы (MM) и плазмноклеточного лейкоза (PCL) *in vitro*, как описано в примере 7. На фиг. 10A-10H показана жизнеспособность специфических клеточных линий множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза, экспрессирующих BCMA, обработанных указанным ADC, в то время как на фиг. 10I и 10J показана жизнеспособность клеточных линий, которые не экспрессируют BCMA.

На фиг. 11 представлен график, иллюстрирующий изменения опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели множественной миеломы H929 в ответ на обработку с помощью нацеливающихся на BCMA ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400 и IgG1 изотипического контроля-SG3400 по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 12 представлен график, иллюстрирующий изменения опухоли в объеме в ксенотрансплантатной мышинной модели плазмноклеточного лейкоза MM. 1S в ответ на обработку с помощью нацеливающихся на BCMA ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400 и IgG1 изотипического контроля-SG3400 по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 13 представлены графики, иллюстрирующие измерения аффинности и показателей кинетики связывания антител 15B2GL, I09, P10 и L15 с BCMA человека с применением системы на основе SPR ProteOn.

На фиг. 14 представлены графики, иллюстрирующие измерения аффинности и показателей кинетики связывания антител N22, M02 и J6M0 с BCMA человека с применением системы на основе SPR ProteOn.

На фиг. 15 представлены графики, иллюстрирующие связывание антител 15B2GL, L15, I09 или J6M0 с клеточными линиями NCI-H929, MM.1S и Ad293+huBCMA, измеренное с помощью проточной цитометрии.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрен конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные с цитотоксином. Термин "конъюгат антитела и лекарственного средства", применяемый в данном документе, относится к соединению, содержащему моноклональное антитело (mAb), присоединенное к цитотоксическому средству (обычно низкомолекулярному лекарственному средству с высокой системной токсичностью) посредством химических линкеров. В некоторых вариантах осуществления ADC может содержать низкомолекулярный цитотоксин, который был химически модифицирован таким образом, чтобы он содержал линкер. Линкер затем используют для конъюгирования цитотоксина с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. После

связывания с антигеном-мишенью на поверхности клетки ADC интернализуется и переносится в лизосому, где цитотоксин высвобождается в результате либо протеолиза расщепляемого линкера (например, с помощью катепсина В, находящегося в лизосоме), либо в результате протеолитического разложения антитела, если оно присоединено к цитотоксину посредством нерасщепляемого линкера. Цитотоксин затем перемещается из лизосомы в цитозоль или ядро, где он затем может связываться со своей мишенью в зависимости от его механизма действия.

Термин "моноклональные антитела", применяемый в данном документе, относится к антителам, которые продуцируются одним клоном В-клеток и связываются с одним и тем же эпитопом. Напротив, термин "поликлональные антитела" относится к популяции антител, которые продуцируются различными В-клетками и связываются с различными эпитопами одного и того же антигена. Конъюгат антитела и лекарственного средства, описанный в данном документе, может содержать целое антитело или фрагмент антитела. Целое антитело, как правило, состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая из тяжелых цепей содержит одну N-концевую вариабельную (VH) область и три C-концевых константных (CH1, CH2 и CH3) области, и каждая легкая цепь содержит одну N-концевую вариабельную (VL) область и одну C-концевую константную (CL) область. Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт антитела. Области VH и VL характеризуются одинаковой общей структурой, при этом каждая область содержит четыре каркасные области, последовательности которых являются относительно консервативными. Каркасные области связаны тремя определяющими комплементарность областями (CDR). Три CDR, известные как CDR1, CDR2 и CDR3, образуют "гипервариабельную область" антитела, которая отвечает за связывание антигена.

ADC может содержать антигенсвязывающий фрагмент антитела. Термины "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "функциональный фрагмент антитела" и "антигенсвязывающая часть" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к одному или нескольким фрагментам или частям антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (см., в целом, Holliger et al., *Nat. Biotech.*, 23(9): 1126-1129 (2005)). Фрагмент антитела может содержать, например, одну или несколько CDR, вариабельную область (или ее части), константную область (или ее части) или их комбинации. Примеры фрагментов антител включают без ограничения (i) Fab-фрагмент, который представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (iv) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой одновалентную молекулу, состоящую из двух доменов Fv-фрагмента (т.е. VL и VH), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать два домена в виде одной полипептидной цепи (см., например, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988); и Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998)); и (v) диатело, которое представляет собой димер полипептидных цепей, где каждая полипептидная цепь содержит VH, присоединенный к VL пептидным линкером, который слишком короткий, чтобы обеспечить образование пар между VH и VL в той же полипептидной цепи, тем самым управляя образованием пар между комплементарными доменами в различных полипептидных цепях VH-VL с образованием димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих сайта. Фрагменты антител известны в уровне техники и описаны более подробно, например, в публикации заявки на патент США 2009/0093024 A1.

В одном варианте осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства, описанный в данном документе, содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA, также известный как CD269). BCMA является представителем суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли (см., например, Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135 (2000) и Mackay et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 21: 231-264 (2003)). BCMA связывается с фактором активации В-клеток (BAFF) и лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL) (см., например, Mackay et al., выше, и Kalled et al., *Immunological Reviews*, 204: 43-54 (2005)). Сообщалось, что среди незлокачественных клеток BCMA экспрессируется в основном в плазматических клетках и подклассах зрелых В-клеток (см., например, Laabi et al., *EMBO J.*, 11(11): 3897-3904 (1992); Laabi et al., *Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154 (1994); Kalled et al., выше; O'Connor et al., *J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97 (2004); и Ng et al., *J. Immunol.*, 173(2): 807-817 (2004)). Мыши с дефицитом BCMA являются здоровыми и имеют нормальные показатели количества В-клеток, но выживаемость долгоживущих плазматических клеток нарушается (см., например, O'Connor et al., выше; Xu et al., *Mol. Cell. Biol.*, 21(12): 4067-4074 (2001); и Schiemann et al., *Science*, 293(5537): 2111-2114 (2001)). РНК BCMA была обнаружена повсеместно в клетках множественной миеломы, а белок BCMA был обнаружен на поверхности плазматических клеток у пациентов с множественной миеломой несколькими исследователями (см., например, Novak et al., *Blood*, 103(2): 689-694 (2004); Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 7(19): 5903-5909 (2007); Bellucci et al., *Blood*, 105(10): 3945-3950 (2005); и Moreaux et al., *Blood*, 103(8): 3148-3157 (2004)).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против BCMA, описанного выше, неза-

висимо от конъюгата антитела и лекарственного средства. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать (а) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и (б) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и/или варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против ВСМА, могут предусматривать любую подходящую аффинность связывания с ВСМА или его эпитопом. Термин "аффинность" относится к константе равновесия для обратимого связывания двух средств и выражается как константа диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к интересующему антигену или эпитопу может быть измерена с применением любого способа, известного в уровне техники. Такие способы включают, например, клеточную сортировку с активацией флуоресценции (FACS), поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore, ProteOn), интерферометрический метод (BLI, например, Octet), анализ кинетического исключения (например, KinExA), отделяемые гранулы (например, магнитные гранулы), антиген для пэннинга и/или ELISA (см., например, Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing, New York, N.Y., 2001). Из уровня техники известно, что аффинность связывания конкретного антитела будет варьироваться в зависимости от способа, который применяют для анализа аффинности связывания.

Растворимая форма ВСМА (sBCMA) была выявлена в сыворотке крови пациентов с множественной миеломой, при этом заявленные значения находились в диапазоне от 3,8 до 1062 нг/мл (Lee et al Br J Haematol 2016, Sanchez et al Br J Haematol 2012), и состояла из полного внеклеточного домена молекулы (Laurent et al. Nat Commun 2015). Следовательно, sBCMA может ослаблять эффекты средств терапии на основе антитела. Функциональные особенности sBCMA и рекомбинантного мономерного ВСМА человека являются идентичными (Laurent et al. Nat Commun 2015). Следовательно, для уменьшения потенциальных эффектов sBCMA в отношении эффективности конъюгата антитела к ВСМА-лекарственное средство желательно выбрать компонент антитела, который обладает слабым связыванием с рекомбинантным мономерным ВСМА человека и сильным связыванием с ВСМА, связанным с мембраной.

Аффинность связывающего средства с лигандом, например, аффинность антитела к эпитопу, может составлять, например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 1 микромоляр/л (мкМ) (например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 1 наномоль/л (нМ) или от приблизительно 1 нмоль/л до приблизительно 1 микромоляр/л (мкМ)). В одном варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с ВСМА с  $K_D$ , составляющей менее или равной 100 наномоль/л (например, 100 нМ, приблизительно 90 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 30 нМ, приблизительно 20 нМ, или приблизительно 10 нМ, или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений). В другом варианте осуществления моноклональное антитело может связываться с ВСМА с  $K_D$ , составляющей менее или равной 10 наномоль/л (например, приблизительно 9 нМ, приблизительно 8,5 нМ, приблизительно 8 нМ, приблизительно 7,5 нМ, приблизительно 7 нМ, приблизительно 6,5 нМ, приблизительно 6 нМ, приблизительно 5,5 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 4,5 нМ, приблизительно 4 нМ, приблизительно 3,5 нМ, приблизительно 3 нМ, приблизительно 2,5 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 1,5 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 0,9 нМ, приблизительно 0,8 нМ, приблизительно 0,7 нМ, приблизительно 0,6 нМ, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,4 нМ, приблизительно 0,3 нМ, приблизительно 0,2 нМ, приблизительно 0,1 нМ, приблизительно 0,05 нМ, приблизительно 0,025 нМ, приблизительно 0,01 нМ, приблизительно 0,001 нМ или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений). В другом варианте осуществления моноклональное антитело может связываться с ВСМА с  $K_D$ , составляющей менее или равной 200 пМ (например, приблизительно 190 пМ, приблизительно 175 пМ, приблизительно 150 пМ, приблизительно 125 пМ, приблизительно 110 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 90 пМ, приблизительно 80 пМ, приблизительно 75 пМ, приблизительно 60 пМ, приблизительно 50 пМ, приблизительно 40 пМ, приблизительно 30 пМ, приблизительно 25 пМ, приблизительно 20 пМ, приблизительно 15 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 5 пМ, приблизительно 1 пМ или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений).

В одном варианте осуществления аффинность антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента к мономерному ВСМА, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), составляет приблизительно 90 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 30 нМ или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений, например, от приблизительно 50 нМ до приблизительно 70

нМ, от приблизительно 55 нМ до приблизительно 65 нМ или от приблизительно 58 нМ до приблизительно 62 нМ.

В одном варианте осуществления аффинность антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента к ВСМА, связанному с мембраной, измеренная с помощью FACS, составляет менее или равняется 10 наномоль/л (например, приблизительно 9 нМ, приблизительно 8,5 нМ, приблизительно 8 нМ, приблизительно 7,5 нМ, приблизительно 7 нМ, приблизительно 6,5 нМ, приблизительно 6 нМ, приблизительно 5,5 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 4,5 нМ, приблизительно 4 нМ, приблизительно 3,5 нМ, приблизительно 3 нМ, приблизительно 2,5 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 1,5 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 0,9 нМ, приблизительно 0,8 нМ, приблизительно 0,7 нМ, приблизительно 0,6 нМ, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,4 нМ, приблизительно 0,3 нМ, приблизительно 0,2 нМ, приблизительно 0,1 нМ, приблизительно 0,05 нМ, приблизительно 0,025 нМ, приблизительно 0,01 нМ, приблизительно 0,001 нМ или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений).

Антигенсвязывающая часть или фрагмент моноклонального антитела могут быть любого размера, при условии, что данная часть связывается с ВСМА. В этом отношении антигенсвязывающая часть или фрагмент моноклонального антитела, направленного против ВСМА (также называемого в данном документе "моноклональное антитело к ВСМА"), желательнее содержит от приблизительно 5 до 18 аминокислот (например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений).

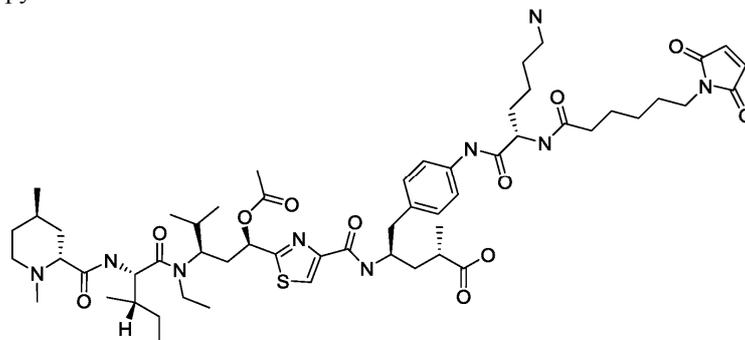
В одном варианте осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства содержит варируемую область моноклонального антитела к ВСМА. В этом отношении ADC может содержать варируемую область легкой цепи, варируемую область тяжелой цепи или как варируемую область легкой цепи, так и варируемую область тяжелой цепи моноклонального антитела к ВСМА. Предпочтительно ADC содержит варируемую область легкой цепи и варируемую область тяжелой цепи моноклонального антитела к ВСМА. Моноклональные антитела, которые связываются с ВСМА, раскрыты, например, в публикации Международной заявки на патент WO 2010/104949. В одном варианте осуществления моноклональное антитело ADC, описанное в данном документе, содержит (а) варируемую область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (HCDR1) SYSMN (SEQ ID NO: 1), аминокислотную последовательность HCDR2 SISGSSNYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) и аминокислотную последовательность HCDR3 GGNYYVEYFQY (SEQ ID NO: 3), и (б) варируемую область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (LCDR1) RASQYISSNYLA (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность LCDR2 GASNRAT (SEQ ID NO: 5) и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 6). В другом варианте осуществления моноклональное антитело ADC, описанное в данном документе, может содержать варируемую область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и/или варируемую область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Термины "цитотоксин" и "цитотоксическое средство" относятся к любой молекуле, которая подавляет выполнение функции клеток или препятствует ему, и/или вызывает разрушение клеток (гибель клеток), и/или оказывает антипролиферативные эффекты. Будет понятно, что цитотоксин или цитотоксическое средство ADC также называется в уровне техники "полезной нагрузкой" ADC. Из данного уровня техники известно, что ряд классов цитотоксических средств потенциально применим в молекулах ADC и может применяться в ADC, описанном в данном документе. Такие классы цитотоксических средств включают, например, средства, воздействующие на микротрубочки, (например, ауристатин и майтанзиноиды), пирролобензодиазепины (PBD), ингибиторы РНК-полимеразы II (например, аматоксины) и средства, алкилирующие ДНК (например, индолинобензодиазепиновые псевдодимеры). Примеры конкретных цитотоксических средств, которые могут применяться в ADC, описанном в данном документе, включают без ограничения аманитин, ауристатин, калихимидин, дауномицин, доксорубин, дуокармицин, доластатин, ендиин, лекситропсин, таксан, пуромицин, майтанзиноид, алкалоид барвинка, тубулицин и пирролобензодиазепины (PBD). Более конкретно цитотоксическое средство может представлять собой, например, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, ауристатин E, паклитаксел, доцетаксел, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолино-доксорубин, ризоксин, цианоморфолинодоксорубин, доластатин-10, эхиномицин, комбретастин, калихимидин, майтанзин, DM1, DM4, винбластин, винбластин, метотрексат, нетропсин или их производные или аналоги. Цитотоксины, подходящие для применения в ADC, также описаны, например, в публикациях Международных заявок на патент №№ WO 2015/155345 и WO 2015/157592.

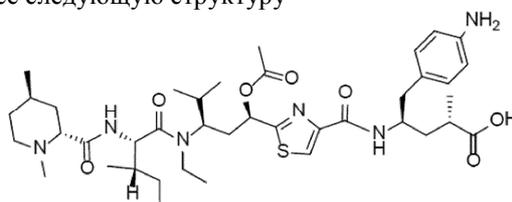
В одном варианте осуществления цитотоксическое средство может представлять собой средство, воздействующее на микротрубочки, такое как тубулицин, майтанзиноид, ауристатин или их производные. Термины "средство, воздействующее на микротрубочки", и "средство, нацеливающееся на микротрубочки", являются синонимичными и относятся к средству, которое подавляет клеточное деление путем воздействия на микротрубочки. Тубулицины являются представителями класса природных веществ, выделенных из видов миксобактерий (Sasse et al., J. Antibiot., 53: 879-885 (2000)), которые действуют как

митотические яды, которые подавляют полимеризацию тубулина и приводят к блокированию клеточного цикла и апоптозу (Steinmetz et al., Chem. Int. Ed., 43: 4888-4892 (2004); Khalil et al., Chem. Biochem., 7: 678-683 (2006); Kaur et al., Biochem. J., 396: 235-242 (2006)). Примеры тубулизинов раскрыты, например, в публикациях Международных заявок на патент №№WO 2015/157594, WO 2004/005326, WO 2012/019123, WO 2009/134279, WO 2009/055562, WO 2004/005327; в патентах США 7776841, 7754885 и 7816377; и в опубликованных заявках на патент США 2010/0240701, 2011/0021568 и 2011/0263650.

В определенных аспектах тубулизин представляет собой соединение, описанное в WO 2015/157594, который включен в данный документ посредством ссылки, такое как, например, соединение, имеющее следующую структуру



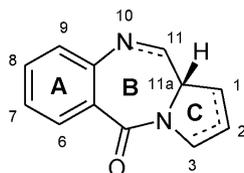
или соединение, имеющее следующую структуру



Майтанзиноиды подавляют полимеризацию белка микротрубочек тубулина, тем самым предотвращая образование микротрубочек (см., например, патент США № 6441163 и Remillard et al., Science, 189: 1002-1005 (1975)). Было показано, что майтанзиноиды подавляют рост опухолевых клеток *in vitro* с применением моделей клеточных культур и *in vivo* с применением систем лабораторных животных. Более того, цитотоксичность майтанзиноидов в 1000 раз выше, чем у традиционных химиотерапевтических средств, таких как, например, метотрексат, даунорубин и винкристин (см., например, патент США 5208020). Майтанзиноиды включают майтанзин, майтанзиол, С-3-сложные эфиры майтанзиола и другие аналоги и производные майтанзиола (см., например, патенты США 5208020 и 6441163). С-3-сложные эфиры майтанзиола могут быть встречающимися в природе или получены синтетическим путем. Более того, как встречающиеся в природе, так и синтетические С-3-сложные эфиры майтанзиола можно классифицировать как С-3-сложный эфир с простыми карбоновыми кислотами или С-3-сложный эфир с производными N-метил-L-аланина, причем последний более цитотоксический, чем первый. Синтетические аналоги майтанзиноида также известны в уровне техники и описаны, например, в Kurchan et al., J. Med. Chem., 21: 31-37 (1978). Способы получения майтанзиола и его аналогов и производных описаны, например, в патенте США 4151042. Примеры майтанзиноидов, которые можно применять в отношении ADC, описанных в данном документе, включают без ограничения N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин (DM1) и N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанзин (DM4).

Ауристатины представляют собой класс высокоэффективных антимиотических средств, которые продемонстрировали значительную доклиническую активность при хорошо переносимых дозах (Law et al., Cancer Res., 66: 2328-2337 (2006); Ma et al., Clin. Cancer Res., 12: 2591-2596 (2006); Tse et al., Cancer Res., 12: 1373-1382 (2006); и Oflazoglu et al., Br. J. Haematol, 142: 69-73 (2008), и Oflazoglu et al., Clin. Cancer Res., 14: 6171-6180 (2008)). Ауристатиновые ADC в настоящее время оценивают в доклинических и клинических испытаниях. Примеры ауристатинов, которые могут применяться в отношении ADC, описанных в данном документе, включают без ограничения монометилауристин E (ММАЕ) и родственную молекулу монометилауристин F (ММАF) (см., например, Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003); и Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17: 114-124 (2006)).

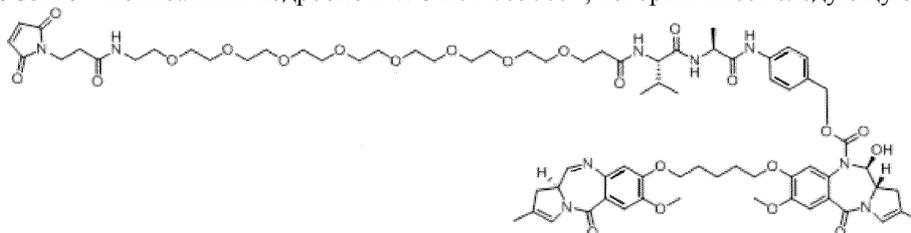
В одном варианте осуществления цитотоксическое средство может представлять собой пирролобензодиазепин (PBD) или производное PBD. PBD перемещается в ядро, где он сшивает ДНК, предотвращая репликацию в ходе митоза, повреждая ДНК за счет односторонних разрывов и впоследствии приводя к апоптозу. Некоторые PBD также способны распознавать и связываться со специфическими последовательностями ДНК. Общая структура для PBD



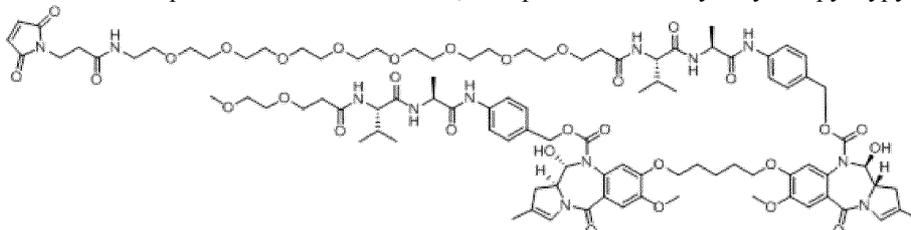
PBD отличаются числом, типом и положением заместителей как в их ароматических А-кольцах, так и в пиррольных С-кольцах, а также степенью насыщения С-колец. В В-кольце присутствует либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламин (NH-CH(OMe)) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, которая обеспечивает им правовращательный поворот, если смотреть от С-кольца в направлении А-кольца. Данный признак также придает PBD соответствующую трехмерную форму для изомерной спиральности с малой бороздой ДНК В-формы, приводя к плотному прилеганию в сайте связывания (Kohn, In: Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); и Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19: 230-237 (1986)). PBD могут образовывать аддукты в малой борозде, что приводит к вмешательству в процессинг ДНК.

Первый противоопухолевый антибиотик на основе PBD, антрамицин, был открыт в 1965 г. (Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc., 87: 5793-5795 (1965); Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc., 87: 5791-5793 (1965)). С тех пор был обнаружен ряд PBD, встречающихся в природе, и было разработано более десяти путей синтеза для получения различных аналогов (Thurston et al., Chem. Rev., 433-465 (1994); и Antonow, D. and Thurston, D.E., Chem. Rev., 111: 2815-2864 (2011)). Представители данного семейства включают аббемицин (Hochlowski et al., J. Antibiotics, 40: 145-148 (1987)), чикамицин (Konishi et al., J. Antibiotics, 37: 200-206 (1984)), DC-81 (патент Японии 58180487; Thurston et al., Chem. Brit., 26: 767-772 (1990); и Bose et al., Tempahedron, 48: 751-758 (1992)), мазетрамицин (Kuminoto et al., J. Antibiotics, 33: 665-667 (1980)), неотрамицины А и В (Takeuchi et al., J. Antibiotics, 29: 93-96 (1976)), поротрамицин (Tsunakawa et al., J. Antibiotics, 41: 1366-1373 (1988)), протракарцин (Shimizu et al., J. Antibiotics, 29: 2492-2503 (1982); и Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52: 91-97 (1987)), сибаномицин (DC-102) (Hara et al., J. Antibiotics, 41: 702-704 (1988); и Itoh et al., J. Antibiotics, 41: 1281-1284 (1988)), сибиромицин (Leber et al., J. Am. Chem. Soc., 110: 2992-2993 (1988)) и томамицин (Arima et al., J. Antibiotics, 25: 437-444 (1972)). PBD, а также ADC, содержащие PBD, также описаны в публикациях Международных заявок на патент №№ WO 2015/155345 и WO 2015/157592.

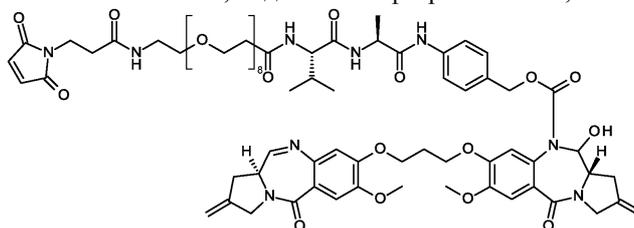
В одном варианте осуществления PBD представляет собой PBD 3249, также называемый в данном документе "SG3249" и описанный подробно в WO 2014/057074, который имеет следующую структуру



В другом варианте осуществления PBD является PBD 3315, также называемый в данном документе "SG3315" и описанный подробно в WO 2015/052322, который имеет следующую структуру



В другом варианте осуществления PBD является SG3400, также называемый соединением 23, который подробно описан в РСТ/EP2017/052988, поданной 10 февраля 2017 г., и имеет следующую структуру



Моноклональное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюги-

рованы с цитотоксином с применением любого подходящего способа, известного в уровне техники, включая сайт-специфические или сайт-неспецифические способы конъюгирования. Обычные стратегии конъюгирования антител, как правило, основаны на случайном конъюгировании (т.е. неспецифическом) полезной нагрузки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по остаткам лизина или цистеина. Соответственно, в некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент случайным образом конъюгированы с цитотоксическим средством, например, путем частичного восстановления антитела или фрагмента антитела, а затем реакцией с необходимым средством с присоединением линкерного фрагмента или без него. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть восстановлены с применением дитиотреитола (ДТТ) или подобного восстановителя. Цитотоксическое средство с присоединенным к нему линкерным фрагментом или без него затем можно добавлять с молярным избытком к восстановленному антителу или фрагменту антитела в присутствии диметилсульфоксида (DMSO). После конъюгирования можно добавлять избыток свободного цистеина для гашения непрореагировавшего средства. Реакционную смесь можно затем очищать и производить замену буфера на фосфатно-буферный солевой раствор (PBS).

В других вариантах осуществления цитотоксическое средство может быть конъюгировано с моноклональным антителом к ВСМА с применением сайт-специфических способов конъюгации по конкретным реакционноспособным аминокислотным остаткам с получением гомогенных препаратов ADC с одинаковой стехиометрией. Сайт-специфическое конъюгирование может происходить по остатку цистеина или по неприродной аминокислоте. В одном варианте осуществления цитотоксическое средство можно конъюгировать с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по меньшей мере одному остатку цистеина. В частности, например, цитотоксическое средство может быть химически конъюгировано с боковой цепью аминокислоты в конкретном положении согласно Kabat в Fc-участке моноклонального антитела к ВСМА. В связи с этим цитотоксическое средство может быть конъюгировано с моноклональным антителом к ВСМА по остатку цистеина в любом подходящем положении в Fc-участке антитела, включая без ограничения цистеин в по меньшей мере одном из положений 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В одном варианте осуществления цитотоксическое средство может быть конъюгировано с моноклональным антителом к ВСМА по остатку цистеина в конкретных положениях 239 и/или 442 по Kabat моноклонального антитела к ВСМА и/или по аминокислотному остатку, вставленному между положениями 239 и 240 по Kabat антитела к ВСМА (Dimasi et al., *Mol Pharm*, 14(5): 1501-1516 (2017)). В качестве альтернативы, цитотоксическое средство может быть конъюгировано с моноклональным антителом к ВСМА или его антигенсвязывающим фрагментом по тиолмалеимидной связи, такой как, например, по сульфгидрильной реакционноспособной группе в шарнирной области и тяжелой-легкой цепях.

Моноклональное антитело к ВСМА, описанное в данном документе, содержит по меньшей мере одну молекулу цитотоксина, конъюгированную с ним; однако моноклональное антитело к ВСМА может содержать любое подходящее количество молекул цитотоксина, конъюгированных с ним (например, 1, 2, 3, 4 или больше молекул цитотоксина), для достижения необходимого терапевтического эффекта. Желательно, чтобы ADC, описанный в данном документе, содержал две молекулы цитотоксина, конъюгированные с моноклональным антителом к ВСМА.

Антитело к ВСМА, описанное в данном документе, применимо для любого терапевтического средства, в котором необходимо нацеливаться на ВСМА, такого как адоптивный клеточный перенос (АСТ), биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE) и наночастицы. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен моноклонального антитела к ВСМА, описанного в данном документе, связанный с фрагментом, обеспечивающим активацию Т-клеток. "Химерный антигенный рецептор (CAR)" представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен антитела (например, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv)), связанный с фрагментами передачи сигнала Т-клеток или активации Т-клеток. Структуры CAR развивались в течение последних двадцати лет и чаще всего включают одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), полученный из моноклонального антитела (mAb), и сигнальный мотив из TCR  $\zeta$ , цепи (называемый CAR "первого поколения" (см., например, Okur, F.V., Brenner, M.K., *Methods Mol. Biol.*, 651: 319-45 (2010)); и Lee et al., *Clin. Cancer. Res.*, 75(10): 2780-2790 (2012)). Совсем недавно были разработаны второе и третье поколение CAR, которые включают один ("второе поколение") или два ("третье поколение") костимулирующих активирующих мотива, например, из CD28, 4-1BB (CD137) и/или CD134 (OX-40), которые усиливают пролиферацию, цитотоксичность и персистенцию *in vivo* (см., например, Finney et al., *J. Immunol.*, 172: 104-13 (2004); Imai et al., *Leukemia*, 18: 676-84 (2004); Maher et al., *Nat Biotechnol.*, 20:70-5 (2002); Milone et al., *Mol Ther.*, 17: 1453-64 (2009)); и Lee et al., выше).

Антигенсвязывающий домен CAR может содержать целое моноклональное антитело или фрагмент моноклонального антитела, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен CAR может содержать одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) моноклонального анти-

тела к ВСМА. Химерные рецепторы антигена и способы получения CAR дополнительно описаны, например, в Riviere, I. and M. Sadelain, *Mol. Ther.*, 25(5): 1117-1124 (2017); Davila, M.L. and M. Sadelain, *Int. J. Hematol*, 104(1): 6-17 (2016); и в публикации заявки на патент США 2015/0051266 A1.

В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая вышеописанные антитело или конъюгат антитела и лекарственного средства и фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель. Любой подходящий носитель, известный в данном уровне техники, может использоваться в контексте настоящего изобретения. Выбор носителя будет частично определен конкретным местом, куда можно вводить композицию, и конкретным способом, применяемым для введения композиции. Композиция необязательно может быть стерильной. Композиции могут быть получены в соответствии с традиционными методиками, описанными, например, в Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

Желательно, чтобы композиция содержала антитело или конъюгат антитела и лекарственного средства в количестве, которое является эффективным для лечения или предупреждения множественной миеломы. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен способ уничтожения клеток множественной миеломы, который включает приведение в контакт клеток множественной миеломы, которые экспрессируют ВСМА, с антителом или конъюгатом антитела и лекарственного средства, описанными в данном документе, или композицией, содержащей антитело или ADC, описанной в данном документе, вследствие чего антитело или конъюгат антитела и лекарственного средства связываются с ВСМА на клетках множественной миеломы и обеспечивают уничтожение клеток множественной миеломы. В настоящем изобретении также предусмотрено применение антитела или ADC, описанных в данном документе, или композиции, содержащей антитело или ADC, в изготовлении лекарственного препарата для лечения множественной миеломы. Как обсуждается в данном документе, множественная миелома, также известная как плазмноклеточная миелома или болезнь Калера, представляет собой рак плазматических клеток, которые являются типом лейкоцитов, обычно ответственных за выработку антител (Raab et al., *Lancet*, 374: 324-329 (2009)). Множественная миелома поражает 1-4 человека на 100000 человек в год. Заболевание более распространено у мужчин и, по неизвестным причинам, в два раза чаще встречается у афроамериканцев, чем у европеоидных американцев. Множественная миелома является наименее распространенной гематологической злокачественной опухолью (14%) и составляет 1% от всех видов рака (Raab et al., выше). Лечение множественной миеломы обычно включает химиотерапию при высоких дозах с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аллогенных или аутогенных); однако высокий уровень рецидивов является обычным у пациентов с множественной миеломой, которые прошли такое лечение. Как рассмотрено выше, ВСМА экспрессируется на высоком уровне в клетках множественной миеломы (см., например, Novak et al., выше; Neri et al., выше; Bellucci et al., выше; и Mogaux et al., выше).

Как продемонстрировано в данном документе, ВСМА также экспрессируется на стволовых клетках множественной миеломы. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен способ уничтожения стволовых клеток множественной миеломы, который включает приведение в контакт стволовых клеток множественной миеломы, которые экспрессируют ВСМА, с конъюгатом антитела и лекарственного средства, описанным в данном документе, или композицией, содержащей ADC, описанной в данном документе, вследствие чего конъюгат антитела и лекарственного средства связывается с ВСМА на стволовых клетках множественной миеломы и обеспечивает уничтожение стволовых клеток множественной миеломы. Стволовые клетки множественной миеломы можно идентифицировать в костном мозге пациентов с множественной миеломой по их поверхностной экспрессии CD19 и отсутствию поверхностной экспрессии CD138 (см., например, Matsui et al., *Blood*, 103: 2332-6 (2004)). Эти клетки являются уникально способными к образованию колоний и приживлению у мышей с иммунодефицитом, при этом плазматические клетки миеломы, определенные как CD138+CD19-, не являются таковыми. Стволовые клетки множественной миеломы также устойчивы к современным средствам терапии (Matsui et al., *Cancer Res.*, 68: 190-7 (2008)).

Конъюгат антитела и лекарственного средства, описанный в данном документе, или композиция, содержащая конъюгат антитела и лекарственного средства, могут быть приведены в контакт с популяцией клеток множественной миеломы, которые экспрессируют ВСМА *ex vivo*, *in vivo* или *in vitro*. "Ex vivo" относится к способам, осуществляемым внутри или на клетках или ткани в искусственной среде вне организма с минимальным изменением природных условий. Напротив, термин "in vivo" относится к способу, который осуществляют внутри живых организмов в их нормальном, интактном состоянии, в то время как способ "in vitro" осуществляют с применением компонентов организма, которые были выделены из их обычного биологического окружения. В одном варианте осуществления клетки множественной миеломы являются клетками множественной миеломы человека, которые приведены в контакт с ADC, описанным в данном документе, или композицией, содержащей ADC, *in vivo*.

Применяемые в данном документе термины "лечение", "осуществление лечения" и т.п. относятся к получению необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно эффект является терапевтическим, т.е., эффект обеспечивает частичное или полное излечение заболевания и/или неблагоприятного симптома, относящегося к заболеванию. С этой целью способ в соответствии с

настоящим изобретением включает введение "терапевтически эффективного количества" антитела, или ADC, или композиции, содержащей антитело или ADC, и фармацевтически приемлемого носителя. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума и способность антитела или ADC вызывать необходимый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективное количество ADC по настоящему изобретению представляет собой количество, которое связывается с ВСМА на клетках множественной миеломы и разрушает их.

В качестве альтернативы, фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т.е. эффект обеспечивает полное или частичное предотвращение заболевания или его симптома. В этом отношении способ в соответствии с настоящим изобретением включает введение "профилактически эффективного количества" ADC или композиции, содержащей ADC, млекопитающему, которое предрасположено к множественной миеломе. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого профилактического результата (например, предупреждения начала заболевания).

Терапевтическую или профилактическую эффективность можно контролировать путем периодической оценки пациентов, получающих лечение. В одном варианте осуществления ADC, описанный в данном документе, подавляет или супрессирует пролиферацию клеток миеломы, экспрессирующих ВСМА, на по меньшей мере приблизительно 10% (например, на по меньшей мере приблизительно 20%, на по меньшей мере приблизительно 30%, на по меньшей мере приблизительно 40%, на по меньшей мере приблизительно 50%, на по меньшей мере приблизительно 60%, на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 90%, или на по меньшей мере приблизительно 100%). Пролиферацию клеток можно измерять с применением любого подходящего способа, известного в уровне техники, такого как измерение включения меченых нуклеозидов (например, 3H-тимидина или бромдезоксипуридина Brd(U)) в геномную ДНК (см., например, Madhavan, H.N., J. Stem Cells Regen. Med., 3(1): 12-14 (2007)).

Антитело или ADC, описанные в данном документе, или композицию, содержащую антитело, ADC, можно вводить млекопитающему (например, человеку) с применением стандартных методик введения, включающей, например, внутривенное, внутривенное, подкожное. Более предпочтительно антитело, или ADC, или композицию, содержащую их, вводят млекопитающему путем внутривенной инъекции.

Антитело или ADC, описанные в данном документе, или композицию, содержащую антитело или ADC, можно вводить с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, которые можно вводить млекопитающему совместно. Термин "совместное введение", используемый в данном документе, относится к введению одного или нескольких дополнительных терапевтических средств и антитела или ADC, описанных в данном документе, или композиции, содержащей антитело или ADC достаточно близко по времени так, чтобы антитело или ADC могли усиливать эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В связи с этим антитело, или ADC, или композицию, содержащую их, можно вводить первыми, а одно или несколько дополнительных терапевтических средств можно вводить вторыми, или наоборот. Например, антитело, или ADC, или композицию, содержащую их, можно вводить в комбинации с другими средствами (например, в качестве адъюванта) для лечения или предупреждения множественной миеломы. В этом отношении антитело, или ADC, или композицию, содержащую антитело или ADC, можно применять в комбинации с по меньшей мере одним другим противораковым средством включая, например, любое подходящее химиотерапевтическое средство, известное в уровне техники, ионизирующее излучение, низкомолекулярные противораковые средства, вакцины против рака, биологические средства терапии (например, другие моноклональные антитела, вирусы, уничтожающие рак, генная терапия и адоптивный перенос Т-клеток) и/или хирургическое вмешательство.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, но, разумеется, их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие его объем.

#### Пример 1.

В данном примере описано получение моноклонального антитела, направленного против антигена созревания В-клеток (ВСМА).

Согласно схеме иммунизации RIMMS, описанной в Kilpatrick et al., Hybridoma, 16(4): 381-389 (1997), самки трансгенных мышей Ablexis (Ablexis, LLC, Сан-Франциско, Калифорния) возрастом шесть недель получали шесть курсов подкожных инъекций очищенного рекомбинантного человеческого (гHu) ВСМА-Fc отдельно (цикл 1) или чередующуюся иммунизацию с помощью как гHu ВСМА-Fc, так и ВСМА-Fc макака-крабеда (Суно ВСМА-Fc) или адгезивных клеток 293 (Ad293), экспрессирующих либо гHu ВСМА, либо Суно ВСМА (цикл 2) в различные области. Мышей иммунизировали в течение курса 13 дней с интервалами 2-3 дня. Для каждого цикла иммунизации мышей сначала анестезировали изофлураном. Иммуноген эмульгировали в полном или неполном адъюванте Фрейнда и адъюванте TITERMAX® Gold (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и билатерально вводили в различные области. Пробы крови

собирали в день 13 и анализировали в отношении связывания антигена с помощью ELISA и FACS на адгезивных клетках 293, экспрессирующих ВСМА человека и макака-крабеда. Мышам с хорошими титрами сыворотки крови вводили бустерную инъекцию перед слиянием и на 17 день умерщвляли. Клетки лимфатического узла собирали и сливали с клеточной линией миеломы P3-X63-Ag8.653 в соответствии со способом слияния с полиэтиленгликолем (Roche Diagnostics, Индианаполис, Индиана) для получения устойчивых гибридом.

Гибридомы, специфичные к ВСМА, идентифицировали путем скрининга супернатантов гибридом в анализе ELISA прямого связывания с последующим FACS в отношении клеток Ad293, экспрессирующих ВСМА. Положительные гибридомы дополнительно тестировали в отношении их способности связывать, интернализировать и уничтожать клетки множественной миеломы NCI-H929 *in vitro* с применением конъюгата на основе вторичного антитела и сапорина, Fab-ZAP (Advanced Targeting Systems, Сан-Диего, Калифорния, IT-48), и с помощью FACS - в отношении связывания с эндогенным ВСМА, экспрессируемым на клеточных линиях. Исходя из интернализации и эффективности уничтожения клеток, гибридомы затем клонировали методом предельных разведений и размножали для очистки антитела и восстановления гена вариабельной области.

Первый цикл приводил к получению панели из 44 связывающих антител только для человека и 4 связывающих антител с перекрестной реактивностью в отношении человека и макака-крабеда. Эти 48 антител затем дополнительно тестировали с помощью FACS на адгезивных клетках 293, экспрессирующих ВСМА, и эндогенных клеточных линиях NCI-H929, экспрессирующих huBCMA. Основную панель из 25 гибридомных линий идентифицировали путем ранжирования антител по наилучшему связыванию с эндогенным ВСМА человека. Всего 11 гибридом выдвинули для субклонирования, увеличения масштаба, секвенирования и очистки. Клоны также оценивали в отношении уничтожения, опосредованного Fab-Zap. Одно антитело (клон 4679) рекомбинантно клонировали в качестве IgG1 человека для дополнительной оценки.

Второй цикл приводил к получению панели из 98 связывающих антител для иммунизации с помощью ВСМА-Fc gHu/Сyno, девять связывающих антител для иммунизации с помощью ВСМА-Fc gHu/Сyno и клеток Ad293, экспрессирующих ВСМА Сyno, и ноль связывающих антител для иммунизации с помощью клеток Ad293, экспрессирующих как Hu, так и Сyno ВСМА. Эти гибридомы дополнительно тестировали на связывание с TAC1 и BAFF-R с помощью FACS, при этом антитела, проявляющие любое выявляемое связывание с TAC1 и BAFF-R, удаляли. Эти вторичные скрининги наряду с анализом Fab-Zap привели к идентификации восьми гибридом, которые выдвинули для клонирования методом предельных разведений (LDC). На основе их активности два клон (клоны 756 и 15B2) затем превращали в IgG1 человека для дополнительной оценки.

Антитела 4679, 756 и 15B2GL (как описано ниже) анализировали с помощью FACS для оценки связывания антител с ВСМА человека, ВСМА макака-крабеда, TAC1 и BAFF-R с применением рекомбинантных форм рецепторов, стабильно экспрессируемых на клетках Ad293. Анализы связывания проводили путем инкубирования антител 4679, 756 и 15B2GL с 200000 клеток при 4°C в течение 45 мин с последующими двумя промывками PBS+2% FBS. Затем клетки инкубировали с мечеными Alexa-Fluor 647 вторичными антителами при 4°C с последующими двумя промывками в PBS+2%FBS. Меченные APC антитела к BAFF-R, TAC1 и ВСМА человека добавляли согласно рекомендованному изготовителем разбавлению в лунки для контроля. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS+2%FBS+DAPI и анализировали связывание антитела с живыми клетками с применением цитометра Becton Dickinson Biosciences LSRII. Антитело 15B2GL было единственным протестированным перекрестно реагирующим антителом к макаку-крабеда, которое не связывается с BAFF-R и/или TAC1, как показано на фиг. 1.

Моноклональное антитело 15B2 подвергали мутации в форму зародышевого типа (15B2GL) с использованием праймеров, разработанных для обеспечения мутации четырех остатков в 15B2, не подвергнутых преобразованию в зародышевый тип. ДНК 15B2 дикого типа использовали в качестве матричной ДНК для мутагенеза QuikChange Lightning (Agilent Genomics, Санта-Клара, Калифорния). Клетки STBIII (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) использовали для трансформации. После проверки последовательности проводили анализы на связывание ВСМА и кинетический анализ для сравнения связывания 15B2GL и 15B2WT и получали коллекцию основных оптимизированных (LO) клонов 15B2GL. Вкратце, 15B2 клонировали в вектор экспрессии FAb, разработанный для бактериальной экспрессии. Двадцать семь остатков в тяжелой цепи и девятнадцать остатков в легкой цепи, каждый из которых подвергали мутации простым образом с применением праймеров, разработанных так, чтобы они обеспечивали возможность использования девятнадцати различных аминокислот, за исключением цистеина. Мутагенез проводили с применением набора QuikChange Lightning Mutagenesis (Agilent Genomics, Санта-Клара, Калифорния).

Примерно сто колоний на положение подвергали скринингу посредством ELISA в отношении связывания для общего количества 6000 клонов. Связывание в ходе ELISA измеряли путем захвата человеческого ВСМА с низкой плотностью и с помощью бактериального супернатанта через 48 ч бактериальной экспрессии. Хиты определили как превышающие более чем в два раза показатель для контроля 15B2GL. Отдельные аминокислотные хиты подтверждали с помощью ELISA для ВСМА макака-крабеда

без связывания с неспецифическим белком. Идентифицированные хиты из скрининга на основе простой модели затем объединяли для разработки праймера для получения комбинаторной библиотеки. Упомянутый выше подход скрининга FAb с помощью анализа связывания ELISA повторяли как для комбинаторной библиотеки с использованием 15B2GL в качестве исходной матрицы и контроля для ELISA. Хиты, идентифицированные после комбинаторного скрининга, затем клонировали в вектор экспрессии IgG млекопитающего ("Maia"), разработанный для конъюгирования с получением ADC. Обеспечивали экспрессию белков в клетках 293НЕК и очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А для дополнительного тестирования.

Способность антитела 15B2GL и LO-клонов 15B2GL к связыванию, интернализации и уничтожению клеток H929 множественной миеломы *in vitro* оценивали с использованием Fab-ZAP и с помощью анализа FACS связывания с эндогенным ВСМА, экспрессируемым в клеточных линиях, как описано выше. Вкратце, антитела инкубировали с 200000 клеток в течение 30 мин при 4°C с последующими двумя промывками PBS+2% FBS. Клетки ресуспендировали в 100 мкл холодного PBS+2% FBS и выдерживали при 4°C. В определенные моменты времени клетки промывали и ресуспендировали в теплом RPMI+10% FBS и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. В конце эксперимента клетки промывали, а затем инкубировали с мечеными Alexa-Fluor 647 вторичными антителами при 4°C с последующими двумя промывками в PBS+2%FBS. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS+2%FBS+DAPI и анализировали связывание антител с живыми клетками с применением цитометра Becton Dickinson Biosciences LSRII. Антитело 15B2GL проявляло уникальную и быструю интернализацию согласно этому способу по сравнению с антителом к ВСМА J6M0 (описанным в патенте США 9273141) и LO-антителами.

На основании связывания ВСМА, кинетических скринингов (рассмотренных выше) и интернализации отобрали моноклональное антитело 15B2GL, а пять LO-клонов (т.е. I09, L15, P10, N22 и M02) выбрали для очистки и конъюгации наряду с 15B2GL.

Аминокислотные последовательности варьируемых областей тяжелых и легких цепей моноклональных антител 15B2 (дикого типа и зародышевого типа) и LO-клоны I09, L15, P10, N22 и M02 показаны в табл. 1.

Таблица 1

Антитело	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
VH 15B2GL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGLTVTVSS	7
VL 15B2GL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYGGSPITFGQGTKLEIK	8
Варибельная область тяжелой цепи (VH) 15B2WT	EIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGLTVTVSS	9
Варибельная область легкой цепи (VL) 15B2WT	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYGGSPITFGQGTKLEIK	10
VH I09	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ QWGQGLTVTVSS	11
VL I09	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYSSDPITFGQGTKLEIK	12
VH L15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGLTVTVSS	13
VL L15	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYADSPITFGQGTKLEIK	14

VH M02	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYVEYFQ YWGQGTLLTVSS	15
VL M02	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYSSDPITFGQGTKLEIK	16
VH N22	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGTLLTVSS	17
VL N22	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYSSSPITFGQGTKLEIK	18
VH P10	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYYIYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYVEYFQ YWGQGTLLTVSS	19
VL P10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYTDSPITFGQGTKLEIK	20

Результаты этого примера демонстрируют получение моноклональных антител, направленных против ВСМА.

#### Пример 2.

В данном примере продемонстрирован способ получения конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC), содержащего моноклональное антитело к ВСМА, конъюгированное с цитотоксином, в соответствии с настоящим изобретением.

Моноклональное антитело 15B2GL и оптимизированные клоны, описанные в примере 1, конъюгировали с полезной нагрузкой PBD SG3249 с применением сайт-специфической конъюгации (Thompson et al., *J. Control Release*, 236: 100-116 (2016); Dimasi et al. *Mol Pharm.* 2017 May 1; 14(5): 1501-1516). В частности, очищенное антитело инкубировали с 40 молярным избытком восстановителя ТСЕР (Трис(2-карбокситетил)фосфин) в PBS, pH 7,2, 1 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) в течение 3 ч при 37°C. После инкубирования восстановитель удаляли путем 2X диализа в PBS, pH 7,2, 1 mM EDTA при 4°C с применением кассет для диализа 10000 MWCO с последующей инкубацией с 20 молярными эквивалентами дегидроаскорбиновой кислоты в течение 4 ч при 25°C. Затем последовательно добавляли восемь эквивалентов полезной нагрузки PBD SG3249 из исходного раствора в 10% (об./об.) DMSO, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при легком вращении. Реакцию конъюгации гасили путем добавления четырех молярных эквивалентов (относительно SG3249) N-ацетилцистеина.

Процесс конъюгирования приводил к образованию агрегатов, составляющему 8-10%. Макромолекулярные агрегаты, реагенты для конъюгации, включая гашеный цистеином SG3249, удаляли с применением хроматографии на керамическом гидроксипатите типа II (ЧТ), как описано ранее (Thompson et al., *J. Control Release*, 236: 100-116 (2016)). Сайт-специфические ADC составляли в 25 mM гистидин-HCl, 7% сахарозы, 0,02% полисорбата-80, pH 6.

Для определения содержания мономеров, агрегатов и фрагментов проводили аналитическую эксклюзионную хроматографию (ВТОР-НPLC) с применением 100 мкг (объем 100 мкл) антител или ADC, которые загружали в колонку TSKgel G3000WXL (Tosoh Bioscience, Токио, Япония). Подвижная фаза состояла из 0,1 M сульфата натрия, 0,1 M фосфата натрия и 10% изопропанола, pH 6,8. Скорость потока составляла 1 мл/мин, а каждый анализ проводили в течение 10 мин при комнатной температуре. Хроматографию гидрофобных взаимодействий (НIC-НPLC) применяли для оценки конъюгации и распределения нагрузки лекарственным средством и проводили ее с использованием колонки с неполярной бутил-смолой (NPR) (4,6 мкм ID×3,5 см, 2,5 мкм, Tosoh Bioscience). Подвижная фаза А состояла из 25 mM Трис-HCl, 1,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,0; а подвижная фаза В состояла из 25 mM Трис-HCl и 5% изопропанола, pH 8,0. 100 мкл антител или ADC при концентрации 1 мг/мл загружали и элюировали при скорости потока 1 мл/мин, с градиентом от 5% В до 100% В в течение 13 мин. Восстановительную обращенно-фазовую хроматографию (rRP-НPLC) применяли для подтверждения конъюгации, специфической для цепи. Антитела и ADC подвергали восстановлению при 37°C в течение 20 мин с использованием 42 mM дитиотреитола (DTT) в PBS (pH 7,2). 10 мкг восстановленных антител или ADC загружали в колонку с полимерной средой с обращенной фазой (PLRP-S) 1000 А (2,1×50 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) и элюировали при 80°C при скорости потока 1 мл/мин, с градиентом от 5% В до 100% В в

течение 25 мин (подвижная фаза А: 0,1% трифторуксусная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле).

Конъюгацию по тяжелых и легких цепях и соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) определяли с помощью анализов путем восстановительной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (rLCMS), которые проводили на Agilent 1290 серии uHPLC, связанном с Agilent 6230 TOF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). 2 мкг восстановленных антител или ADC загружали в колонку быстрого разделения с высоким разрешением (RRHD) 300-дифенил ZORBAX (2,1×50 мм, 1,8 мкм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) и элюировали при скорости потока 0,5 мл/мин, с применением ступенчатого градиента 80% В после 2,1 мин (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде и подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Получали положительное изображение времяпролетного MS сканирования, а сбор и обработку данных проводили с помощью программного обеспечения MassHunter (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). DAR рассчитывали с использованием данных rLCMS, как описано в Thompson et al., выше.

Эффективность конъюгации определяли с помощью следующего уравнения, где использовали теоретическое DAR 2:

$$\text{Эффективность конъюгации} = (\text{определенное DAR} \times \text{теоретическое DAR}) \times \frac{1}{100}$$

Значения эффективности конъюгации и DAR тестируемых антител представлены в табл. 2.

Таблица 2

Название конструкции	Полезная нагрузка	Эффективность конъюгации	Соотношение лекарственное средство:антитело (DAR)
15B2GL	SG3249	91	1,82
I09	SG3249	91	1,82
L15	SG3249	90	1,80
M02	SG3249	92	1,84
N22	SG3249	91	1,82
P10	SG3249	93	1,86

Результаты этого примера демонстрируют получение ADC, содержащих моноклональное антитело к ВСМА, конъюгированное с пирролобензодиазепином, в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 3.

В данном примере продемонстрирована аффинность связывания моноклональных антител к ВСМА, описанных в данном документе, с мономерным (растворимым) и связанным с мембраной ВСМА.

Связывание моноклонального антитела 15B2GL и оптимизированных клонов I09, L15, P10, N22 и M02 (описаны в примере 1) оценивали с использованием мономерного sBCMA человека (GenScript, Пискатауэй, Нью-Джерси) с применением устройства ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния). Связывание J6M0 также оценивали для сравнения. Применяли стандартное иммобилизирование по аминокислотной группе для иммобилизации 25 мкг/мл поликлонального антитела к Fc (Jackson ImmunoResearch, Вест Грив, Пенсильвания), полученного в 10 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4,5), на поверхности биосенсорного чипа ProteOn GLC (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния), предварительно активированного 20 мМ EDAC (гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида) и 5 мМ сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид), с плотностью ~200-600 резонансных единиц (RU). 15B2GL, I09, L15, P10, N22, M02 и J6M0 последовательно впрыскивали при концентрации 1 мкг/мл для захвата иммобилизованным поликлональным антителом к Fc. Сенсограмму регистрировали с помощью протекания двукратных разбавлений sBCMA, полученного в PBS (pH 7,4) с 0,005% (об./об.) Tween-20, в диапазоне 100-6,25 нМ, над захваченной поверхностью в течение 150 с при 75 мкл/мин при времени диссоциации 600 с. Программное обеспечение для анализа данных ProteOn применяли для анализа данных.

Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 13 и 14 и в табл. 3.

Таблица 3  
Измерения показателей кинетики с применением BioRad ProteOn

Антитело	Kon	Koff	Kd	nM
15B2GL	3,73E+05	2,27E-02	6,07E-08	60,7
N22	5,36E+05	8,73E-03	1,63E-08	16
I09	6,09E+05	5,99E-03	9,82E-09	9,8
M02	4,99E+05	4,97E-03	9,95E-09	9,9
L15	8,54E+05	3,86E-03	4,51E-09	4,5
P10	7,01E+05	3,73E-03	5,32E-09	5,3
J6M0	4,21E+05	4,69E-04	1,11E-09	1

Связывание 15B2GL, I09, L15 и J6M0 с ВСМА человека, связанным с мембраной, оценивали с применением проточной цитометрии в клеточных линиях множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза, которые эндогенно экспрессируют ВСМА (NCI-H929 и MM.1S соответственно). Связывание 15B2GL, I09, L15 с ВСМА человека, связанным с мембраной, также оценивали в клетках Ad293, экспрессирующих ВСМА человека. Анализы связывания проводили путем инкубирования антител к ВСМА с 200000 клеток в течение 30 мин при 4°C с последующими двумя промывками PBS+2% FBS (буфер FACS). Диапазон концентраций антитела оценивали с применением 12-значной серии 3-кратных разведений. Затем клетки инкубировали с 5 мкг/мл козьего вторичного антитела к IgG человека AF647 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) при 4°C с последующими двумя промывками PBS+2%FBS. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS+2%FBS+DAPI.

Флуоресценцию живых отдельных клеток измеряли с применением цитометра BD Biosciences LSRII и программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC, Ашленд, Орегон). Средние значения интенсивности флуоресценции использовали для определения процентной доли связывания, а EC50 определяли с применением программного обеспечения Prism (GraphPad Software Inc, Ла-Хойя, Калифорния). Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 15. Краткое описание SPR и данные "кажущейся аффинности", измеренные путем проточной цитометрии, показаны в табл. 4.

Таблица 4

Антитело	Аффинность связывания (нМ), мономерный ВСМА	Кажущаяся аффинность (нМ), связанный с клетками ВСМА		
		NCI-H929	MM.1S	Ad293+huBCMA
15B2GL	60,7	3,14	2,56	3,87
N22	16	Н. о.	Н. о.	Н. о.
I09	9,8	5,4	4,8	5,3
M02	9,9	Н. о.	Н. о.	Н. о.
L15	4,5	4,2	4,2	4,48
P10	5,3	Н. о.	Н. о.	Н. о.
J6M0	1	6,02	6,65	Н. о.

Н. о. = не определено.

Результаты данного примера демонстрируют, что моноклональное антитело к ВСМА 15B2GL характеризуется сильным связыванием с ВСМА, связанным с мембраной, и слабым связыванием с мономерным (растворимым) ВСМА, которое в этом отношении является уникальным среди моноклональных антител, которые проанализировали в этих анализах.

Пример 4.

В данном примере продемонстрированы способы уничтожения клеток множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза *in vitro* с применением конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе.

Уничтожение клеточных линий множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза с помощью конъюгатов антитела и лекарственного средства, содержащих 15B2GL или его клоны с оптимизированной аффинностью, конъюгированные с SG3249, оценивали *in vitro* с применением протокола, рекомендуемого в наборе CELLTITER-GLO® (Promega, Мэдисон, Висконсин). Уничтожение клеточных линий множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза с помощью свободного поражающего элемента

SG3199 также оценивали с применением протокола, рекомендуемого в наборе CELLTITER-GLO® (Promega, Мэдисон, Висконсин). Вкратце,  $5 \times 10^3$  клеток в 80 мкл RPMI+10% FBS добавляли во внутренние лунки 96-луночного планшета с белыми стенками (Corning® Costar®, Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Тестировали следующие клеточные линии, экспрессирующие ВСМА: NCI-H929, EJM, MM.1R, JLN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1 и L363. ВСМА-отрицательные клеточные линии Raji и Jurkat также тестировали. Конъюгаты антитела и лекарственного средства разбавляли до 5х исходным раствором (2,5 мкг/мл) в RPMI+10% FBS. Варианты обработки затем серийно разбавляли 1:3 в RPMI+10% FBS. 20 мкл этой серии добавляли к клеткам в двухкратной повторности, что приводило к получению кривой с 12 точками дозы конъюгата антитела и лекарственного средства, находящейся в диапазоне от 0,5 мкг/мл в наивысшей концентрации до  $3 \times 10^{-6}$  мкг/мл в наименьшей. Контроли, представляющие собой конъюгат изотипическое антитела и лекарственного средства (IgG1-SG3249 и IgG1-mc-MMAF) и только среду, также включали. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 96 ч. В конце периода инкубирования 100 мкл раствора субстрата (Promega, Мэдисон, Висконсин) добавляли в каждую лунку. Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера EnVision Multilabel (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Анализировали данные и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Калифорния) и определяли концентрацию полумаксимального ингибирования (IC50).

Информацию о хромосомной транслокации для каждой клеточной линии брали из Moreaux et al, 2011 и Voersma-Vreugdenhil et al, 2004. Количество рецепторов ВСМА определяли с использованием 15B2, меченного AF647 (набор Alexa Fluor 647 Protein Labeling, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) и набора Quantum™ MESF для Alexa Fluor 647 (Bangs Laboratories, Фишерс, Индиана).

Результаты данного эксперимента показаны в табл. 5 и на фиг. 2А-2J.

Таблица 5

Цитотоксичность *in vitro* в клеточных линиях множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза

Клеточная линия	Происхождение заболевания	Хромосомная транслокация	Количество рецепторов ВСМА	15B2GL-SG3249 IC50 (нг/мл)	SG3199 IC50 (пМ)
NCI-H929	MM	t(4;14)	18931	5,99	5
EJM	MM	t(14;20)	14325	153	22
MM.1R	PCL	t(14;16)	9449	8,64	3
JLN-3	MM	t(14;16)	3221	36,28	13
OPM-2	MM	t(4;14)	2873	201	19
MM.1S	PCL	t(14;16)	2698	26,8	3
U266B1	MM	t(11;14)	2340	39,7	155
L-363	PCL	t(20;22)	930	31,4	Н. и.
Raji	Лимфома Беркита	Н. п.	0	>500	Н. и.
Jurkat	Т-лимфоцит	Н. п.	0	>500	3

ВСМА = антиген созревания В-клеток; н. п. = не применимо; н. и. = не исследовали.

Способность ADC 15B2GL-SG3249 уничтожать клетки множественной миеломы *in vitro* в присутствии растворимого ВСМА (sBCMA) по сравнению с I09-SG3249 ADC оценивали в клетках MM.1S с помощью описанного выше протокола, за исключением того, что тестируемые клеточные линии также обрабатывали кондиционированной средой, содержащей ВСМА, собранной из клеток Ad293, экспрессирующих ВСМА человека (фиг. 3А и 3В). Уничтожение клеток с помощью ADC 15B2GL-SG3249 в присутствии sBCMA также сравнивали с ADC, содержащими антитело к ВСМА J6M0, которое описано в патенте США № 9273141. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 3, на которой продемонстрировано, что активность ADC 15B2GL-SG3249 поддерживалась в присутствии клинически значимых уровней sBCMA в большей степени, чем ADC I09-SG3249 (фиг. 3А), J6M0-mc-MMAF и J6M0-SG3249 (фиг. 3В и табл. 6).

Таблица 6

sBCMA (нг/мл)	Тестируемый образец	IC50 (нг/мл)	Кратность потери эффективности
720	15B2GL-SG3249	29,12	2,01
270	15B2GL-SG3249	22,86	1,58
75	15B2GL-SG3249	16,09	1,11
0	15B2GL-SG3249	14,47	1,00
720	J6M0-SG3249	92,92	19,29
270	J6M0-SG3249	32,26	6,70
75	J6M0-SG3249	12,83	2,66
0	J6M0-SG3249	4,816	1,00
720	I09-SG3249	16,16	5,75
270	I09-SG3249	5,548	1,98
75	I09-SG3249	3,791	1,35
0	I09-SG3249	2,809	1,00
720	J6M0-mc-MMAF	1458	49,80
270	J6M0-mc-MMAF	159,7	5,45
75	J6M0-mc-MMAF	55,55	1,90
0	J6M0-mc-MMAF	29,28	1,00

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что ADC 15B2GL-SG3249 обеспечивает уничтожение клетки множественной миеломы и плазмоклеточного лейкоза *in vitro*, и что активность в уничтожении клеток сохранялась даже в присутствии растворимого BCMA. В частности, ADC 15B2GL-SG3249 являлся цитотоксичным как для MM.1S, так и для NCI-H929 *in vitro*, уничтожая в среднем 95% опухолевых клеток в присутствии sBCMA при уровнях не более 720 нг/мл с небольшим влиянием на IC50. ADC, разработанные из антител, которые обладают аффинностью, аналогичной для мономерного BCMA и BCMA, связанного с мембраной, демонстрировали снижение эффективности, зависящее от дозы sBCMA, с 20-кратным сдвигом в IC50 в присутствии 720 нг/мл sBCMA.

#### Пример 5.

В данном примере продемонстрированы способы уничтожения клеток множественной миеломы и плазмоклеточного лейкоза *in vivo* с использованием конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе.

Подкожные мышинные модели ксенотрансплантата множественной миеломы и плазмоклеточного лейкоза получали путем имплантации клеточных линий множественной миеломы или плазмоклеточного лейкоза, экспрессирующих BCMA (т.е. NCI-H929, JLN-3, MM.1S и MM.1R) самкам CB-17 SCID (C.B-17/1CrHsd-Prkdc-scid) или бестимусных (Foxn1<sup>tm</sup>) мышей с применением MATRIGEL™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Когда опухоли достигали примерно 180 мм<sup>3</sup> (клетки NCI-H929), 190 мм<sup>3</sup> (клетки JLN3), 160 мм<sup>3</sup> (клетки MM.1S) или 175 мм<sup>3</sup> (клетки MM.1R), мышей рандомизировали на основе размера опухоли и помещали в группы введения доз и обрабатывали ADC, нацеливающимися на BCMA, как описано ниже.

#### Ксенотрансплантатная модель NCI-H929.

Мышей обрабатывали либо однократной внутривенной дозой ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 при 0,3 мг/кг, либо введением внутривенно дозы J6M0-mc-MMAF еженедельно в дозе 0,3 мг/кг в течение 2 недель. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 и L15-SG3249, наблюдали в течение 99 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 4. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

#### Ксенотрансплантатная модель JLN3.

Мышей обрабатывали либо однократной внутривенной дозой ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 и L15-SG3249 при 1 мг/кг, либо введением внутривенно дозы ADC J6M0-mc-MMAF еженедельно в дозе 1 мг/кг в течение 3 недель. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 и L15-SG3249, наблюдали в течение 104 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 5. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

#### Ксенотрансплантатная модель MM.1S.

Мышей обрабатывали либо однократной внутривенной дозой ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249,

L15-SG3249 при 1 мг/кг, либо введением внутривенно дозы J6M0-мс-MMAF дважды в неделю в дозе 1 мг/кг в течение 4 недель. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 15B2GL-SG3249, 109-SG3249 и L15-SG3249, наблюдали в течение 99 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 6. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

Ксенотрансплантатная модель MM.1R.

Мышей обрабатывали либо однократной внутривенной дозой 15B2GL-SG3249 при 1 мг/кг, либо введением внутривенно дозы J6M0-мс-MMAF еженедельно в дозе 3 мг/кг в течение 4 недель. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 15B2GL-SG3249, наблюдали в течение 109 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 7. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что ADC 15B2GL-SG3249 проявляет повышенную противоопухолевую эффективность *in vivo* по сравнению с другими ADC, которые нацеливаются на клетки, экспрессирующие ВСМА.

Пример 6.

В данном примере продемонстрировано, что стволовые клетки множественной миеломы экспрессируют ВСМА.

В костном мозге пациентов со множественной миеломой (ММ) содержится небольшая популяция раковых стволовых клеток (CSC), которые можно идентифицировать в костном мозге пациентов по их поверхностной экспрессии CD19 и отсутствию поверхностной экспрессии CD138 (Matsui et al., Blood, 103: 2332-6 (2004)).

Экспрессию ВСМА оценивали по популяции стволовых клеток образцов четырех пациентов с множественной миеломой посредством проточной цитометрии. Образцы получали от Proteogenex, Inc. (Калвер-Сити, Калифорния) (см. табл. 7) и отдельные образцы множественной миеломы (ММ) оттаивали на водяной бане при 37°C.

Таблица 7  
Информация о пациенте с ММ

ID образца	Пол	Возраст	Этническая принадлежность	Клинический диагноз	Состояние заболевания
			б		
MM263B M	M	63	Европеоидная раса	ММ	Установлен диагноз
MM277B M	F	66	Европеоидная раса	ММ	Установлен диагноз
MM276B M	F	81	Европеоидная раса	ММ	Установлен диагноз
MM284B M	M	84	Европеоидная раса	ММ	Устойчив к терапии

Оттаявшие клетки добавляли к 10 мл PBS и подсчитывали с применением счетчика ViCELL™ (Beckmann-Coulter Life Sciences, Индианаполис, Индиана). Аликвоту клеточной суспензии получали для анализа образования колоний, в то время как остальную часть клеточной суспензии центрифугировали при низкой скорости для осаждения клеток. Fc клеток блокировали согласно инструкциям производителя, затем высевали при 200000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. Планшет центрифугировали для осаждения клеток, раствор для блокирования Fc сливали и образцы клеток ресуспендировали в буфере для окрашивания BV с последующим окрашиванием с помощью соответствующей панели антител, состоящей из напрямую конъюгированных антител, поставляемых из коммерческих источников, которые показаны в табл. 8 и 9.

Таблица 8  
Окрашивающая панель антител

Образец	Описание	Панель антител
1	Отдельное окрашивание BV510	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510
2	Отдельное окрашивание PE	CD138-PE
3	Отдельное окрашивание APC	CD19-APC
4	Отдельное окрашивание PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7
5	Без окрашивания	
6	Отдельное окрашивание DAPI	DAPI
7	FMO (BV510)	CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
8	FMO (PE)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
9	FMO (APC)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, BCMA-PE/Cy7, DAPI
10	FMO (PE/Cy7)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, DAPI
11	Все окрашивания	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI
12	FMO (DAPI)	CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7
13	Компенсаторные гранулы BV510	CD193-BV510
14	Компенсаторные гранулы PE	CD138-PE
15	Компенсаторные гранулы APC	CD19-APC
16	Компенсаторные гранулы PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7

Таблица 9

Антитела, используемые для анализа с помощью проточной цитометрии

Антитело/реагент	Клон	Поставщик	№ по кат.
CD3-BV510	OKT3	Biolegend	317332
CD34-BV510	581	Biolegend	343528
CD14-BV510	M5E2	Biolegend	301842
CD193-BV510	5E8	Biolegend	310722
CD19-APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437
CD138-PE	B-A38	Beckman Coulter	A40316
BCMA-PE/Cy7	19F2	Biolegend	357508
DAPI		ThermoFisher Scientific	62248
FC Block		BD Pharmingen	564220
Буфер для окрашивания Horizon Brilliant		BD Biosciences	563794
Гранулы Ultra Comp		eBiosciences	01-2222-42

Кроме того, компенсаторные гранулы окрашивали по отдельности тестируемыми антителами. Планшет инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 мин. Планшет центрифугировали и клетки промывали в DPBS+2% FBS с последующим ресуспендированием в 200 мкл DPBS+2% FBS+DAPI. Клетки из каждой лунки оценивали на проточном цитометре BD LSRII (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и получали FCS-файлы. Идентификацию клеток проводили с применением следующей стратегии гейтирования: компенсацию осуществляли с помощью автоматической компьютерной матрицы в FlowJo®10 (FlowJo LLC, Ашленд, Орегон) с применением данных для компенсаторных гранул и отдельного окрашивания. Плазматические клетки гейтировали по графику FSC-A относительно SSC-A, затем отбирали в отношении живых отдельных клеток по графику DAPI относительно SSC-W. Затем применяли эксклюзивное гейтирование для удаления клеток, которые положительно окрашивались в отношении CD3, CD14, CD34 и CD193 на графике BV-510 относительно SSC-A. Данную популяцию затем анализировали на графике CD138-PE относительно CD19-APC. Гистограммы для экспрессии BCMA получали в случае популяции MM CSC, определенной как CD19+/CD138-, и популяции плазматических клеток MM, определенной как CD19-/CD138+. Расположение гейтов в анализе устанавливали на основе соответствующих контролей образцов с комбинацией детектируемых по флуоресценции меток без одной (FMO). Все образцы демонстрировали небольшую процентную долю клеток CD138+CD19-, которые были положительными в отношении экспрессии BCMA, как показано на фиг. 7. Уровень экспрессии BCMA в популяции стволовых клеток был обычно равным уровню, наблюдаемому в плазматических клетках, за исключением MM277, где уровень был ниже, но все еще положительным в отношении экспрессии BCMA.

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что BCMA экспрессируется на раковых стволовых клетках множественной миеломы.

#### Пример 7.

В данном примере продемонстрировано, что конъюгат антитела и лекарственного средства 15B2GL-SG3249 обеспечивает уничтожение стволовых клеток множественной миеломы.

Поскольку стволовые клетки MM способны образовывать колонии *in vitro* (Matsui et al., Blood, 103: 2332-6 (2004)), тестировали способность ADC 15B2GL-SG3249 уничтожать клоногенные клетки в биоптатах костного мозга пациентов с MM, которые характеризировали в примере 2. В частности, клетки подсчитывали с применением счетчика ViCELL™ (Beckmann-Coulter Life Sciences, Индианаполис, Индиана) и ресуспендировали в IMDM+2% FBS при плотности, в 10 раз более высокой, чем требуется для посева. METHOCULT™ H4434 Classic (StemCell Technologies, Inc., Ванкувер, Британская Колумбия, Канада) смешивали с 2000 клеток на мл в случае MM263, MM284 и MM276 и 4000 клеток на мл в случае MM277, следуя инструкциям производителя. Затем добавляли 25-400 нг на мл тестируемых ADC 15B2GL-SG3249 и J6M0-*mc*-MMAF в соответствующие пробирки. Контрольное антитело IgG1-SG3249 добавляли только при высокой дозе 400 нг на мл. Все пробирки тщательно встряхивали для перемешивания, а затем оставляли в состоянии покоя, что позволяло пузырькам воздуха подниматься вверх. После того, как пузырьки поднимались, 400 мкл удаляли с помощью иглы с тупым концом 16 калибра и осторожно помещали в одну лунку 24-луночного планшета со сверхнизкой адгезией (VWR, Раднор, Пенсильвания). Каждый вариант обработки помещали в двух повторностях во внутренние лунки планшета.

Добавляли PBS во внешние лунки и планшет инкубировали при 37°C в течение 7-10 дней. Колонии подсчитывали на глаз с подтверждением образования колонии путем сканирования планшетов на Celigo® Image Cytometer (Nexcelom Biosciences, Лоренс, Массачусетс). Как показано на фиг. 8, во всех 4 случаях 15B2GL-SG3249 был способен уничтожить клоногенные клетки, в то время как J6M0-мс-MMAF - нет. При самой высокой протестированной дозе (400 нг/мл) 15B2GL-SG3249 был способен уничтожить 100% колоний в случае MM263 и MM284 и 87,5% и 91% колоний в случае MM276 и MM277 соответственно. Напротив, концентрация 400 нг/мл J6M0-мс-MMAF не обеспечивала уменьшение количества образованных колоний в случае MM263, а приводила только к уменьшению образования колоний на 12,5%, 40% и 50% в случае MM276, MM277 и MM284 соответственно.

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что конъюгат антитела и лекарственного средства 15B2GL-SG3249 нацеливается на раковые стволовые клетки множественной миеломы, экспрессирующие ВСМА, и обеспечивает их уничтожение.

Пример 8.

В данном примере продемонстрированы способы уничтожения клеток множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза *in vitro* с применением конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе.

Уничтожение клеточных линий множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза с помощью конъюгатов антитела и лекарственного средства, содержащих 15B2GL, конъюгированный с SG3400, оценивали *in vitro* с использованием набора CELLTITER-GLO® (Promega, Мэдисон, Висконсин), как описано в примере 4. Тестировали следующие клеточные линии, экспрессирующие ВСМА: NCI-H929, EJM, MM.1R, JLN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1 и L363. ВСМА-отрицательные клеточные линии Raji и Jurkat также тестировали. Конъюгаты антитела и лекарственного средства разбавляли до 5х исходным раствором (25 мкг/мл) в RPMI+10% FBS. Варианты обработки затем серийно разбавляли 1:3 в RPMI+10% FBS. 20 мкл этой серии добавляли к клеткам в двухкратной повторности, что приводило к получению кривой с 12 точками дозы конъюгата антитела и лекарственного средства, находящейся в диапазоне от 5 мкг/мл в наивысшей концентрации до  $2,8 \times 10^{-5}$  мкг/мл в наименьшей. Контроли, представляющие собой конъюгат изотипического антитела и лекарственного средства (IgG1-SG3400) и только среду, также включали. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 96 ч. В конце периода инкубирования 100 мкл раствора субстрата (Promega, Мэдисон, Висконсин) добавляли в каждую лунку. Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера EnVision Multilabel (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Анализировали данные и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Калифорния). Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 10A-10J.

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что ADC 15B2GL-SG3400 обеспечивает уничтожение клеток множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза *in vitro*.

Пример 9.

В данном примере продемонстрированы способы уничтожения клеток множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза *in vivo* с использованием конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе.

Подкожные мышинные модели ксенотрансплантата множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза получали путем имплантации клеточных линий множественной миеломы или плазмноклеточного лейкоза, экспрессирующих ВСМА (т.е. NCI-H929 и MM.1S), самкам мышей CB-17 SCID (C.B-17/1crHsd-Prkdc-scid) с применением MATRIGEL™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Когда опухоли достигали примерно 200 мм<sup>3</sup> (клетки NCI-H929) или 180 мм<sup>3</sup> (клетки MM.1S), мышей рандомизировали на основе размера опухоли и помещали в группы введения доз и обрабатывали ADC, нацеливающимися на ВСМА, как описано ниже.

Ксенотрансплантатная модель NCI-H929.

Мышей обрабатывали с помощью либо однократной внутривенной дозы ADC IgG1-SG3400 при 1 мг/кг, либо 15B2GL-SG3400 при 0,3 мг/кг, либо 1 мг/кг, либо введения внутривенно дозы J6M0-SG3400 при однократной дозе 0,3 мг/кг или 1 мг/кг. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 15B2GL-SG3400, наблюдали в течение 74 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 11. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

Ксенотрансплантатная модель MM.1S.

Мышей обрабатывали с помощью либо однократной внутривенной дозы ADC IgG1-SG3400, либо 15B2GL-SG3400 при 1 мг/кг или 3 мг/кг, либо введения внутривенно дозы J6M0-SG3400 при дозе 1 мг/кг или 3 мг/кг. Контрольных мышей оставляли необработанными. Мышей, обработанных 3 мг/кг J6M0-SG3400, наблюдали в течение 85 дней после имплантации опухоли, при этом признаки повторного роста опухоли отсутствовали, как показано на фиг. 12. Ни в одной из групп введения доз не наблюдали потери массы тела.

С помощью результатов данного примера продемонстрировано, что ADC 15B2GL-SG3400 проявля-

ет противоопухолевую эффективность *in vivo*.

С помощью данных, описанных в примерах, продемонстрировано, что ADC, содержащий моноклональное антитело 15B2GL, проявляет сильную противоопухолевую активность в доклинических моделях ММ. Важно отметить, что эксперименты *in vitro* указывают на то, что данная активность сохраняется в присутствии sBCMA. С помощью этих данных дополнительно продемонстрировано, что ADC 15B2GL-SG3249, несущий сильную полезную нагрузку PBD, эффективно нацеливается как на плазматические клетки объемной миеломы, так и на более пассивные клоногенные клетки CD19+/CD138-, что может дать возможность для более длительного клинического ответа при этом генетически неоднородном заболевании.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

Использование терминов в единственном числе и термин "по меньшей мере один" и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование термин "по меньшей мере один", за которым следует список из одного или нескольких элементов (например, "по меньшей мере один из А и В") подразумевает один элемент, выбранный из списка элементов (А или В), или любую комбинацию из двух или более из перечисленных элементов (А и В), если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует понимать, как открытые термины (т.е. означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное. Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было индивидуально упомянуто в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных фраз (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, а не для формулирования ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакая фраза в настоящем описании не должна толковаться как указание, что какой-либо незаявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

Предпочтительные варианты осуществления данного изобретения описаны в данном документе, включая лучший вариант, известный авторам настоящего изобретения для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в уровне техники после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники используют такие вариации как подходящие, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, упомянутого в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено действующим законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

#### Перечень последовательностей

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> КОНЪЮГАТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ВСМА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

<130> BCMA-100-US-NP

<150> 62/596194

<151> 2017-12-08

<150> 62/539825

<151> 2017-08-01

<160> 20

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn  
 1 5

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 2

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 3  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 3

Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 8  
 <211> 108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

046403

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 9  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 9

Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 108

046403

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

046403

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Gln Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12  
<211> 108  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asp Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 13  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

046403

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14  
<211> 108  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 15  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

046403

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16  
<211> 108  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asp Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 17  
<211> 120  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

046403

<220>

<223> синтетический

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 18

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro  
85 90 95

046403

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 19  
 <211> 120  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 20  
 <211> 108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asp Ser Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA), конъюгированные с цитотоксином, где моноклональное антитело содержит (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и (b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 6.

2. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

3. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п.1 или 2, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

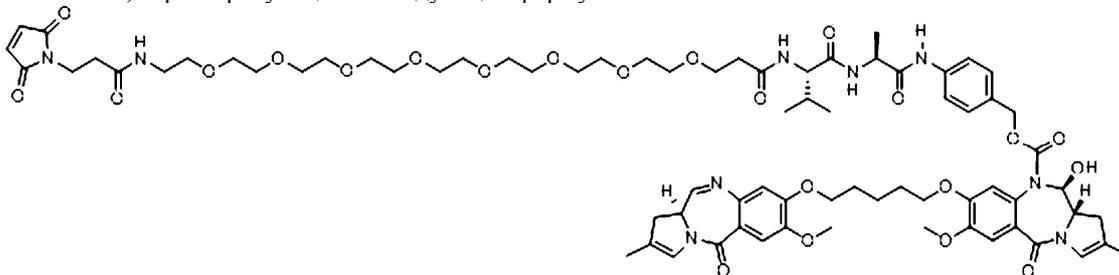
4. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп.1-3, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

5. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп.1-4, где цитотоксин представляет собой средство, воздействующее на микротрубочки, пирролобензодиазепин (PBD), ингибитор РНК-полимеразы II или средство, алкилирующее ДНК.

6. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п.5, где цитотоксин представляет собой средство, воздействующее на микротрубочки, выбранное из группы, состоящей из майтанзиноида, ауристагина и тубулизина.

7. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п.5, где цитотоксин представляет собой пирролобензодиазепин (PBD).

8. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п.7, где пирролобензодиазепин представляет собой SG3249, характеризующийся следующей формулой



9. Композиция для лечения множественной миеломы, содержащая конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ уничтожения клеток множественной миеломы, включающий приведение в контакт клеток множественной миеломы, которые экспрессируют BCMA, с конъюгатом антитела и лекарственного средства по любому из пп.1-8, вследствие чего конъюгат антитела и лекарственного средства связывается с BCMA на клетках множественной миеломы и обеспечивает уничтожение клеток множественной миеломы.

11. Способ уничтожения клеток множественной миеломы, включающий приведение в контакт клеток множественной миеломы, которые экспрессируют BCMA, с композицией по п.9, вследствие чего

конъюгат антитела и лекарственного средства связывается с ВСМА на клетках множественной миеломы и обеспечивает уничтожение клеток множественной миеломы.

12. Способ по п.10 или 11, где клетки множественной миеломы находятся в организме человека.

13. Способ по п.10 или 11, где клетки множественной миеломы находятся *in vitro*.

14. Способ уничтожения стволовых клеток множественной миеломы, включающий приведение в контакт стволовых клеток множественной миеломы, которые экспрессируют ВСМА, с конъюгатом антитела и лекарственного средства по любому из пп.1-8, вследствие чего конъюгат антитела и лекарственного средства связывается с ВСМА на стволовых клетках множественной миеломы и обеспечивает уничтожение стволовых клеток множественной миеломы.

15. Применение композиции по п.9 в изготовлении лекарственного препарата для лечения множественной миеломы.

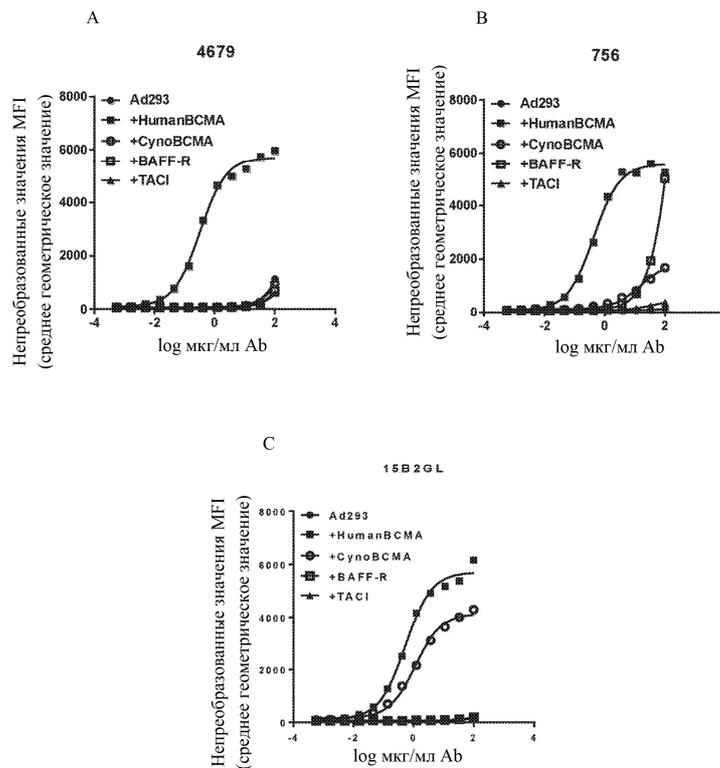
16. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против антигена созревания В-клеток (BCMA), которые содержат (а) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (HCDR1) под SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 2 (HCDR2) под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 3 (HCDR3) под SEQ ID NO: 3, и (б) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 2 (LCDR2) под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 3 (LCDR3) под SEQ ID NO: 6.

17. Моноклональное антитело по п.16, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

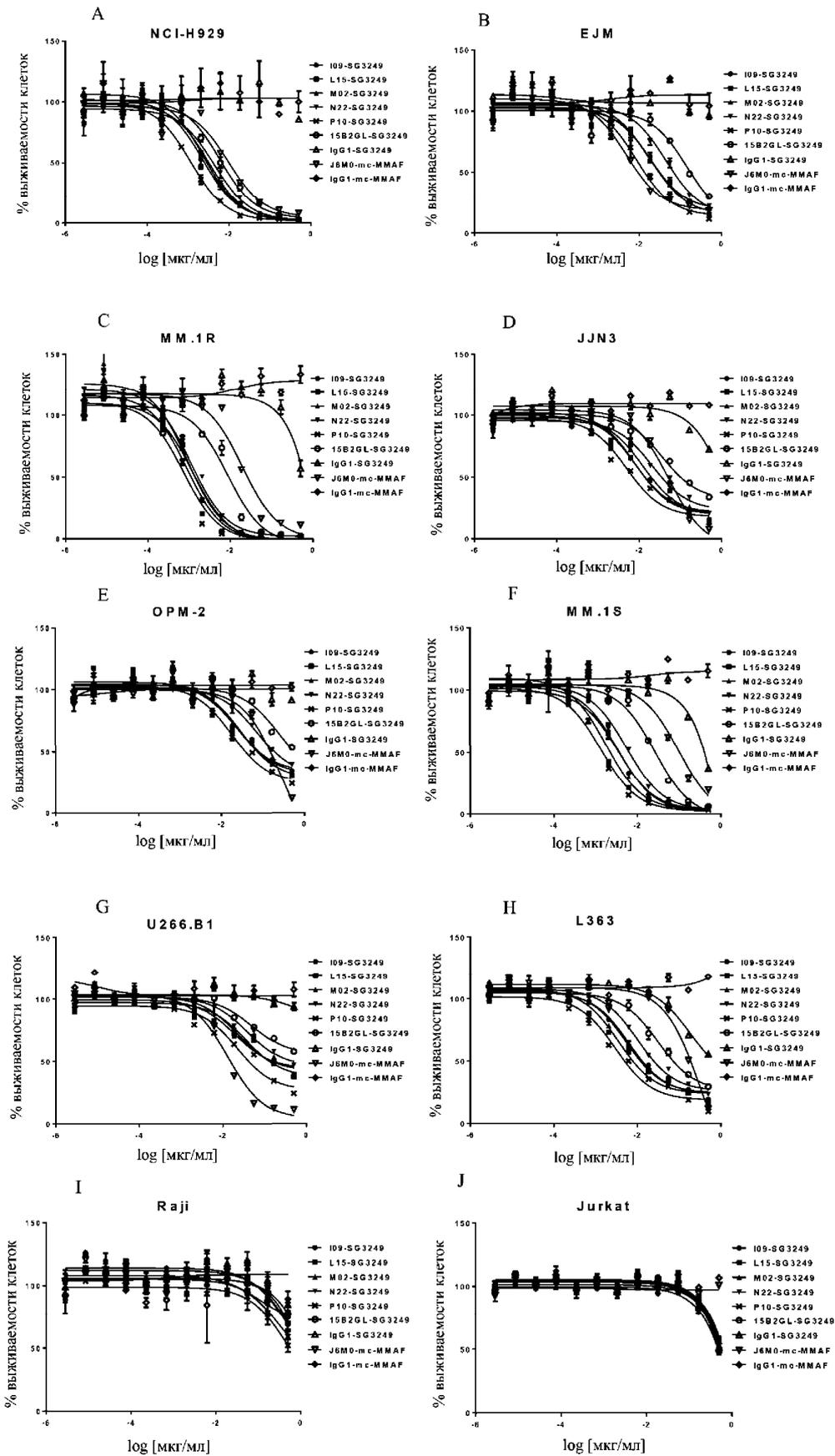
18. Моноклональное антитело по п.16 или 17, где варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

19. Моноклональное антитело по любому из пп.16-18, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

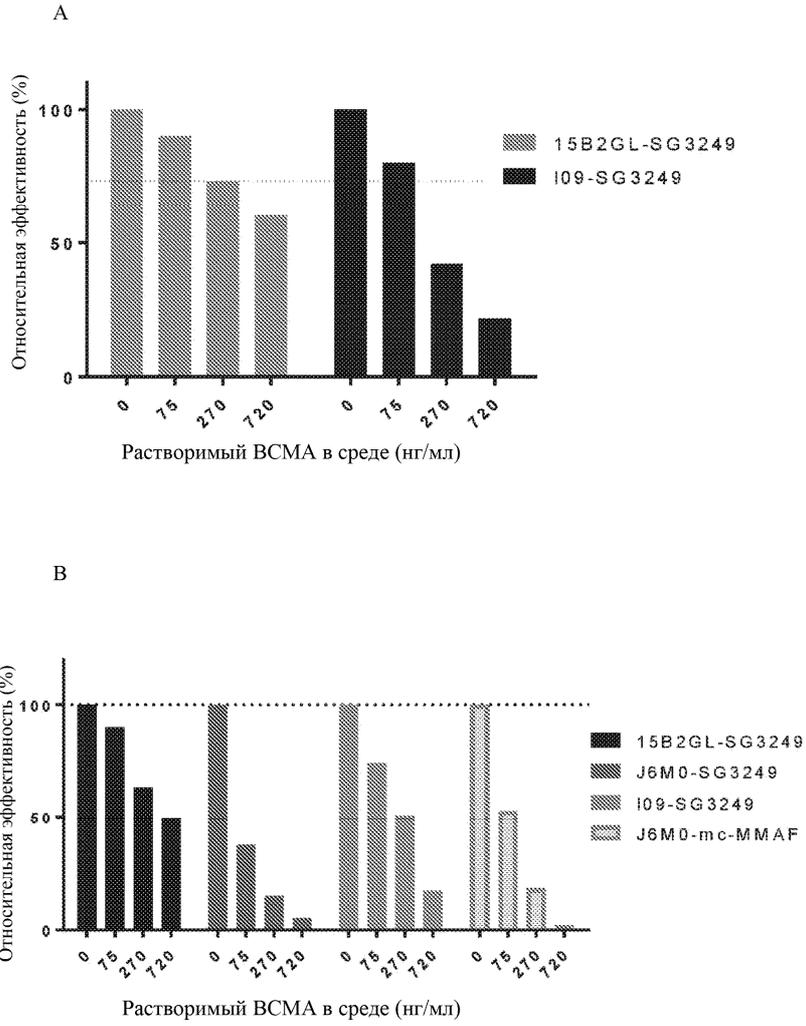
20. Композиция для лечения множественной миеломы, содержащая моноклональное антитело по любому из пп.16-19 и фармацевтически приемлемый носитель.



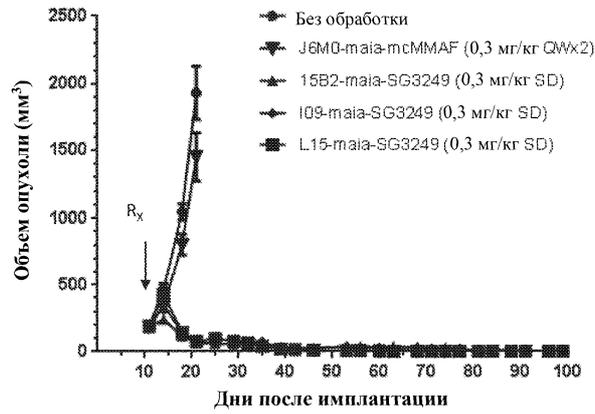
Фиг. 1



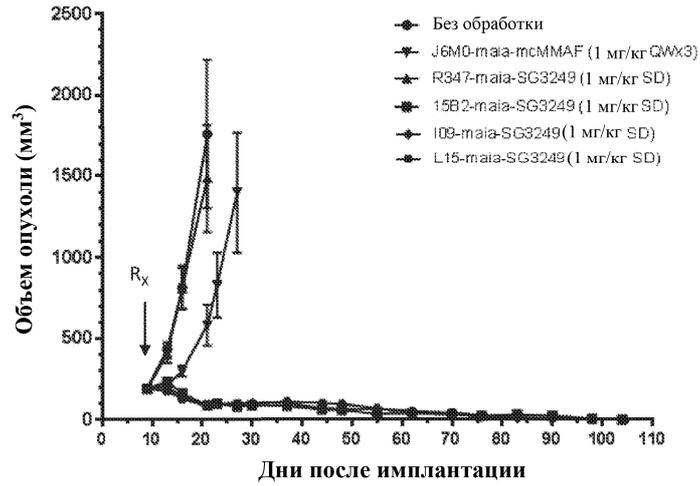
Фиг. 2



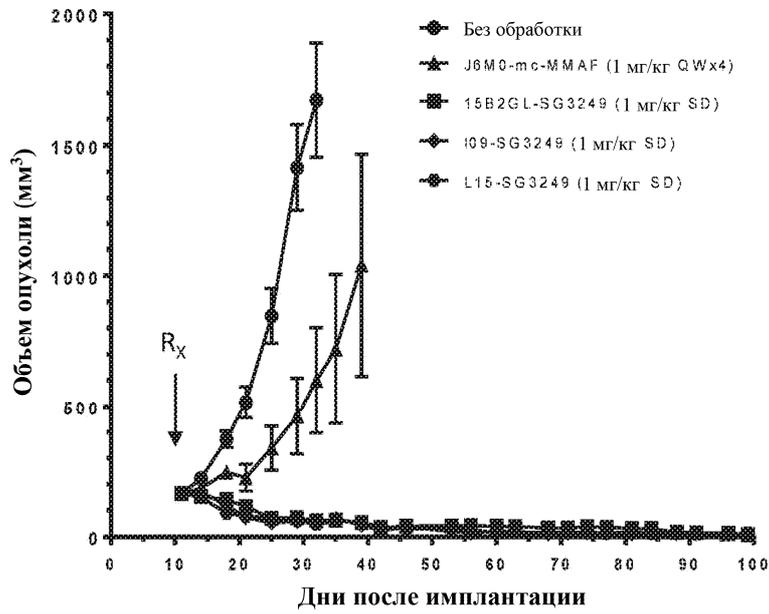
Фиг. 3



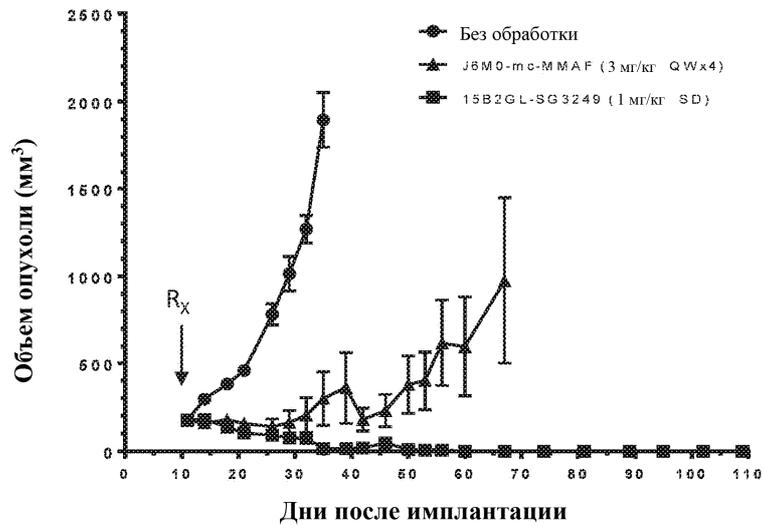
Фиг. 4



Фиг. 5

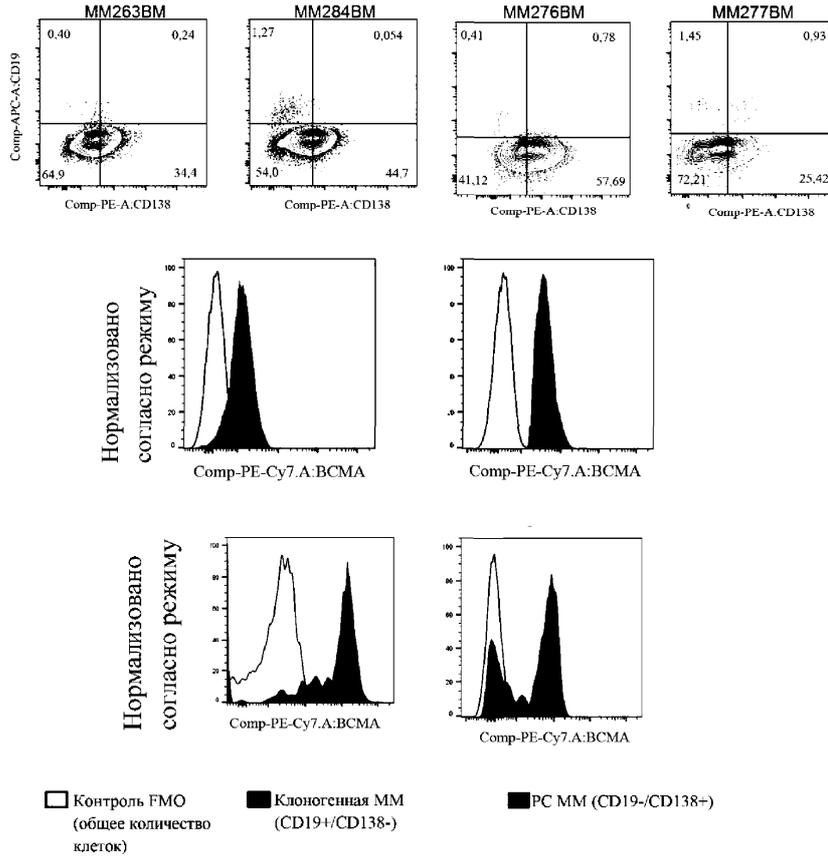


Фиг. 6

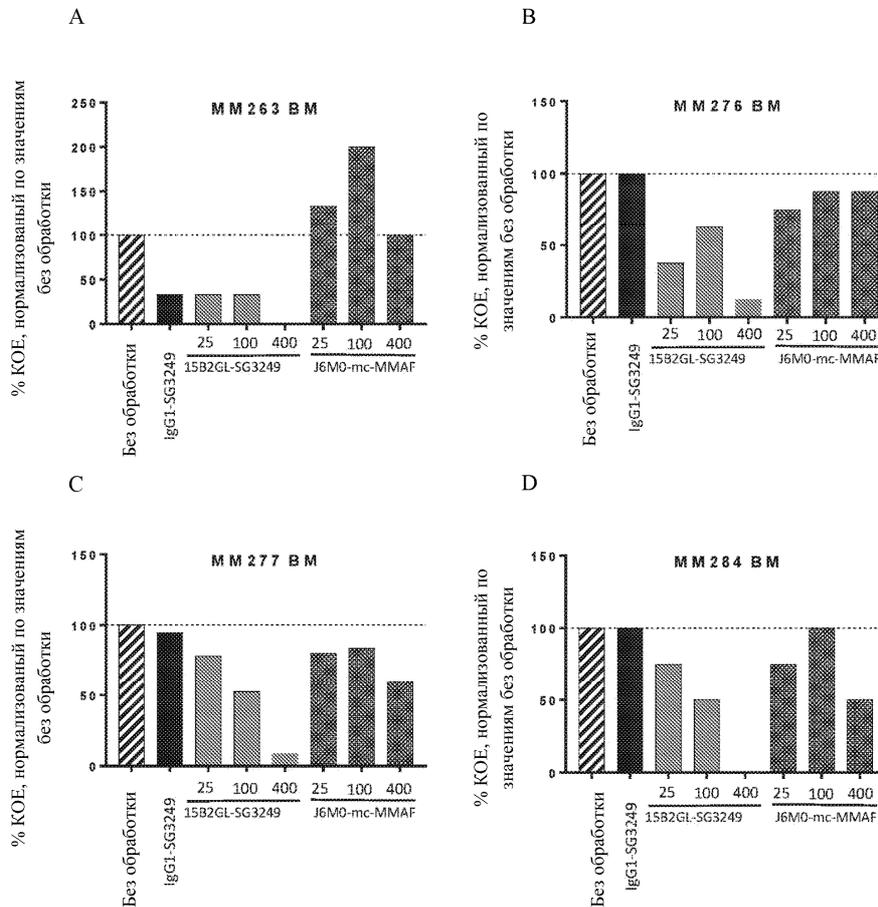


Фиг. 7

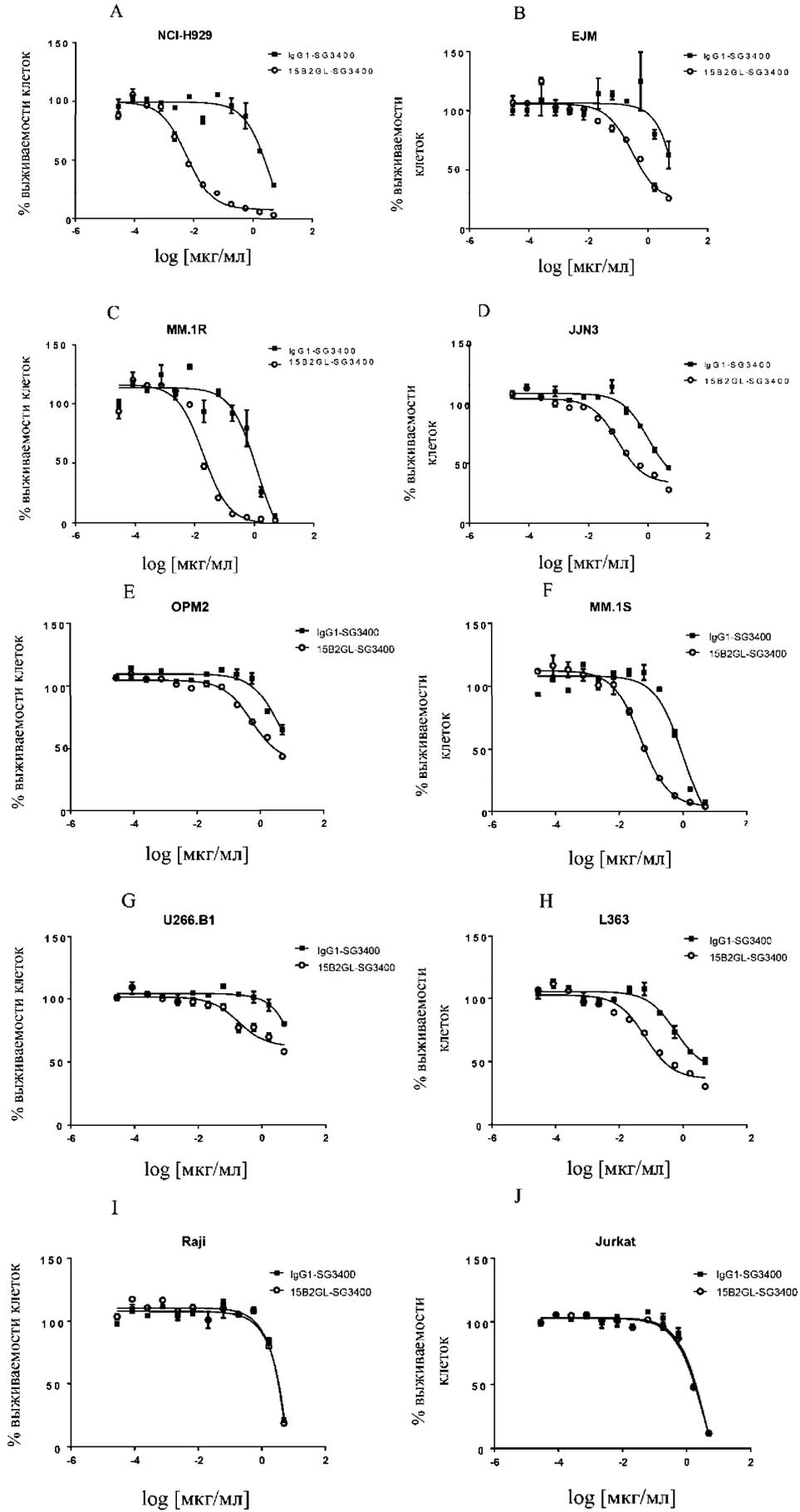
Профиль CD19/CD138



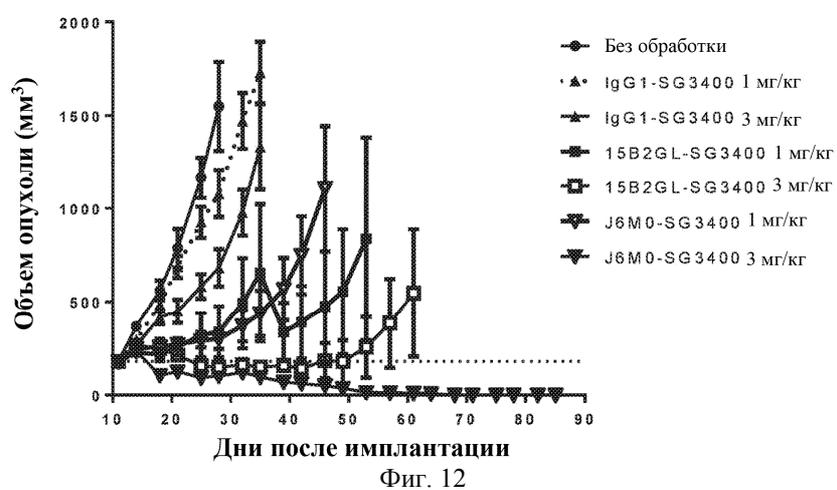
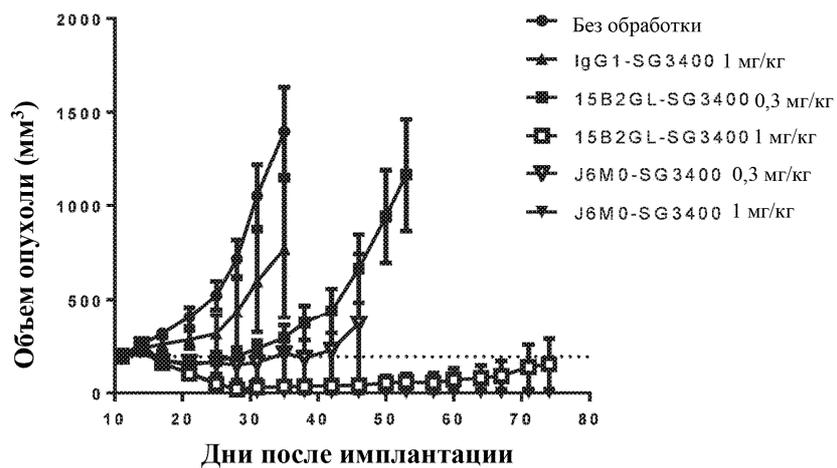
Фиг. 8

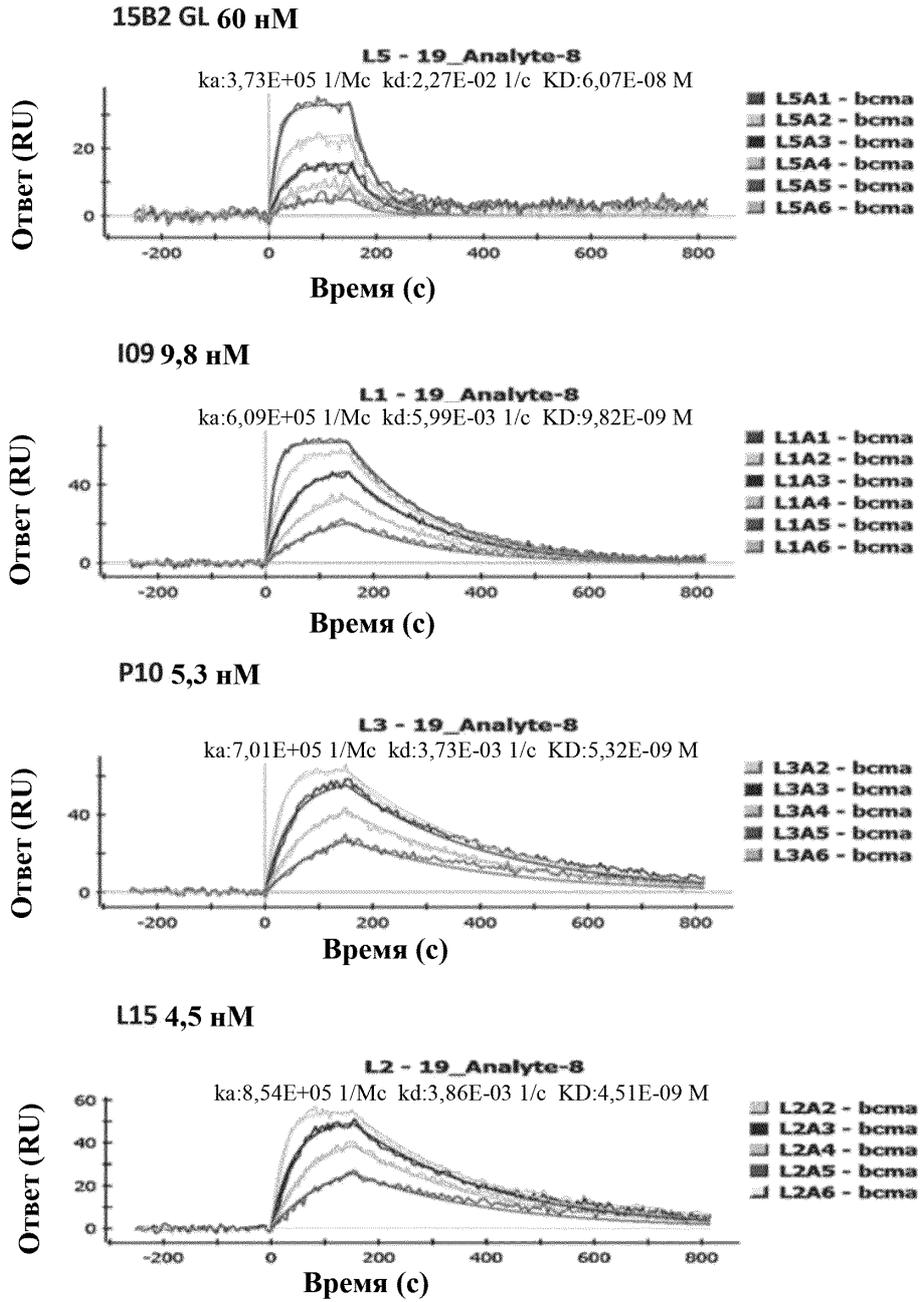


Фиг. 9



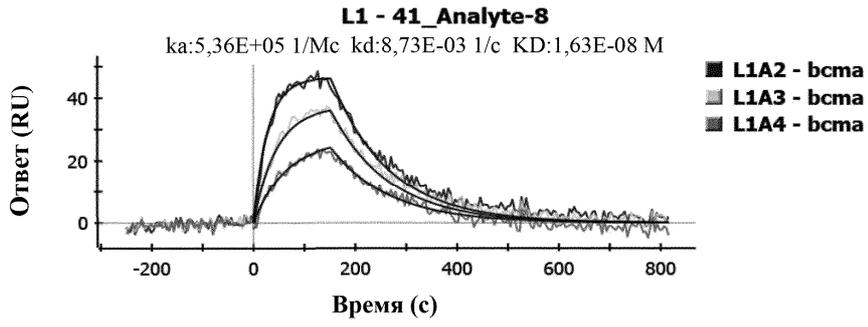
Фиг. 10



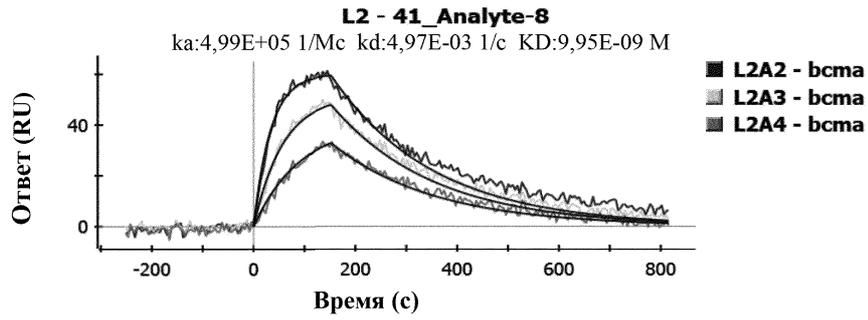


Фиг. 13

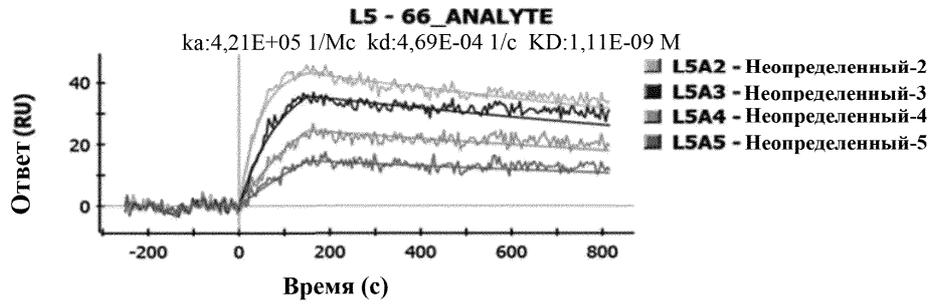
N22 16,0 нМ



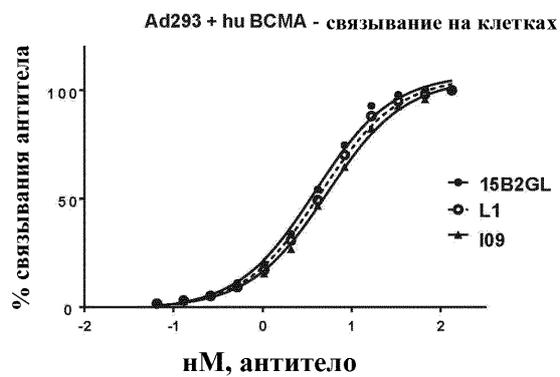
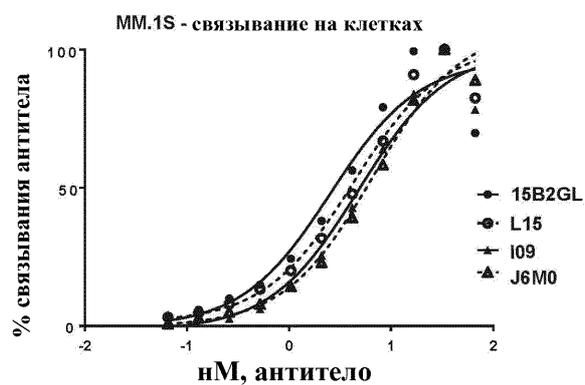
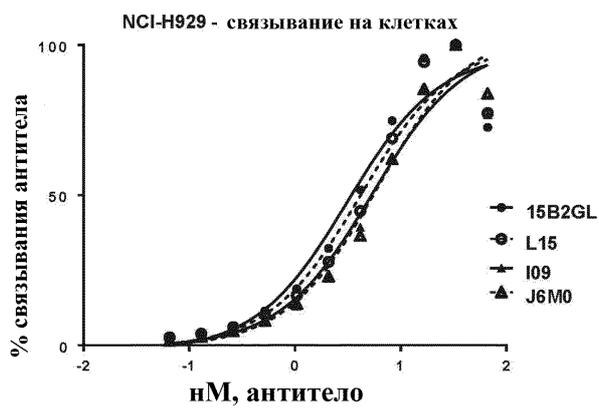
M02 9,9 нМ



J6M0 1 нМ



Фиг. 14



Фиг. 15

