

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046708**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.12**

(21) Номер заявки  
**201991227**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.09.19**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С CD3 И CD20, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **61/704,029; 61/753,461; 61/763,110;  
61/827,098**

(32) **2012.09.21; 2013.01.17; 2013.02.11;  
2013.05.24**

(33) **US**

(43) **2020.02.28**

(62) **201590613; 2013.09.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Смит Эрик, Пападопулос Николас  
Дж. (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **US-A1-20100331527  
EP-A2-1629011**

JONATHAN M. GALL et al.: T cells armed with anti-CD3×anti-CD20 bispecific antibody enhance killing of CD20+ malignant B cells and bypass complement-rituximab resistance in vitro, *Experimental Hematology*, 2005, Vol. 33, pp. 452-459, весь документ

WO-A1-2004024771  
PAUL J. CARTER: Potent antibody therapeutics by design, *Natural Reviews Immunology*, 2006, Vol. 6, N. 5, pp. 343-357, весь документ

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с CD3, и к способам их использования. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по изобретению связываются с CD3 человека с высокой аффинностью и индуцируют пролиферацию Т-клеток человека. Изобретение относится к антителам, которые связываются с CD3 и индуцируют опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с CD20 человека. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению способны ингибировать рост В-клеточных опухолей, экспрессирующих CD20. Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению подходят для лечения заболеваний и нарушений, при которых желательным и/или терапевтически эффективным является активированный или индуцированный целевой иммунный ответ. Например, антитела по изобретению подходят для лечения различных злокачественных опухолей, а также других связанных с CD20 заболеваний и нарушений.

**B1****046708****046708****B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые являются специфическими для CD3, и к способам их использования. Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD3 и молекулой-мишенью, такой как CD20, и к способам их использования.

#### Предшествующий уровень техники

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-клетках совместно с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR), и является необходимым для активации Т-клетками. Функциональный CD3 образован димерной ассоциацией двух из четырех различных цепей: эпсилон, дзета, дельта и гамма. Расположение димеров CD3 включает гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета. Было показано, что антитела против CD3 приводят к образованию кластеров CD3 на Т-клетках, таким образом, вызывая активацию Т-клеток способом, аналогичным взаимодействию TCR с нагруженными пептидами молекулами MHC. Таким образом, антитела против CD3 были предложены для терапевтических целей, включая активацию Т-клеток. Кроме того, биспецифические антитела, которые способны связываться с CD3 и антигеном-мишенью, были предложены для терапевтических применений, включая направление Т-клеточных иммунных ответов на ткани и клетки, экспрессирующие антиген-мишень.

CD20 представляет собой негликозилированный фосфопротеин, экспрессируемый на клеточных мембранах зрелых В-клеток. CD20 рассматривают как В-клеточный опухолеассоциированный антиген, т.к. он экспрессируется при более 95% В-клеточных неходжкинских лимфом (NHL) и других В-клеточных злокачественных новообразованиях, но он отсутствует на предшественниках В-клеток, дендритных клетках и плазматических клетках. В данной области известны способы лечения злокачественной опухоли путем направленного воздействия на CD20. Например, химерное моноклональное антитело против CD20 ритуксимаб использовали или рекомендовали для применения при лечении злокачественных опухолей, таких как NHL, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и мелкоклеточная лимфома (SLL). Полагают, что CD20 уничтожает экспрессирующие CD20 опухолевые клетки посредством опосредованной комплементом цитотоксичностью (CDC), антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичностью (ADCC) и/или индукцией апоптоза и повышению чувствительности к химиотерапии. Несмотря на то, что в условиях клиники для стратегий направленной доставки в опухоль с использованием антител против CD20 продемонстрировали многообещающие результаты, не все пациенты реагируют на терапию антителами против CD20, и для некоторых пациентов было продемонстрировано развитие устойчивости или у них выявляли неполные реакции на терапию антителами против CD20 (например, устойчивость к ритуксимабу).

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 и антигеном-мишенью (таким как CD20) могут быть подходящими при терапевтических применениях, при которых желательными являются конкретная направленная доставка и опосредованный Т-клетками цитолитический эффект, экспрессирующих антиген-мишень.

#### Краткое описание сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 человека. Антитела по этому аспекту изобретения в числе прочего являются подходящими для направленной доставки в Т-клетки, экспрессирующие CD3 и для стимуляции активации Т-клеток, например, в условиях, когда благоприятным и желательным является опосредованный Т-клетками цитолитический эффект. Антитела против CD3 по изобретению, или их антигенсвязывающие участки можно включать как часть биспецифического антитела, которое направляет опосредованную CD3 активацию Т-клеток по отношению к конкретным типам клеток, таким как опухолевые клетки, или возбудителям инфекции.

Иллюстративные антитела против CD3 по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем описании. В табл. 1 указаны идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей (HCVR) тяжелой цепи и переменных областей (LCVR) легкой цепи, а определяющие комплементарность области также тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против CD3. В табл. 2 указаны идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител против CD3.

Настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или

по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к антителам или, их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащихся в любых иллюстративных антителах против CD3, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H2712N), 114/122 (например, H2M2609N), 514/522 (например, H2M3563N), 770/778 (например, H1H5778P), 1050/1234 (например, H1H7195B) и 1090/1234 (например, H1H7208B).

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 (LCDR1) легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 (LCDR2) легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 (LCDR3) легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любых иллюстративных антителах против CD3, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, H1H2712N), 120/128 (например, H2M2609N), 520/528 (например, H2M3563N), 776/784 (например, H1H5778P), 1056/1240 (например, H1H7195B) и 1096/1240 (например, H1H7208B).

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим серию из шести CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любых иллюстративных антителах против CD3, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления серия аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H1H2712N), 116-118-120-124-126-128 (например, H2M2609N), 516-518-520-524-526-528 (например, H2M3563N), 772-774-776-780-782-784 (например, H1H5778P), 1052-1054-1056-1236-1238-1240 (например, H1H7195B) и 1092-1094-1096-1236-1238-1240 (например, H1H7208B).

В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим серию из шести CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3-

LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотной последовательности HCVR/LCVR, как определено любыми иллюстративными антителами против CD3, перечисленными в табл. 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим серию аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащуюся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H2712N), 114/122 (например, H2M2609N), 514/522 (например, H2M3563N), 770/778 (например, H1H5778P), 1050/1234 (например, H1H7195B) и 1090/1234 (например, H1H7208B). Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и их можно использовать для идентификации CDR в конкретных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описываемых в настоящем описании. Иллюстративные правила, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение AbM. В общих терминах определение по Kabat основано на вариабельности последовательности, определение по Chothia основано на локализации областей структурной петли, и определение AbM является компромиссом между подходами по Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-948 (1997) и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989). Для идентификации последовательностей CDR в антителе также доступны общедоступные базы данных.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против CD3 или их участки. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR содержит серию из трех CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3), где серия аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является такой, как определено любыми иллюстративными антителами против CD3, перечисленными в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR содержит серию из трех CDR (например, LCDR1-LCDR2-LCDR3), где серия аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является такой, как определено любыми иллюстративными антителами против CD3, перечисленными в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с этими последовательностями. В определенных вариантах осуществления по этому аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR получают из одного и того же антитела против CD3, приведенного в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела против CD3. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из молекул нуклеиновой кислоты, указанных выше, например, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. В объем настоящего изобретения также входят клетки-хозяева в которые вводили такие векторы, а также к способам получения антител или их участков путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продукцию антител или фрагментов антител и выделение антител и фрагментов антител, продуцируемых таким образом.

Настоящее изобретение относится к антителам против CD3 с модифицированным профилем гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления подходящей может быть модификация для удаления нежелательных участков гликозилирования, или антитело, не содержащее группу фукозы, содержащуюся в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al., (2002) JBC, 277:2 6733). В других применениях можно проводить модификацию галактозилирования для модификации обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, который специфически связывается с CD3, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела против CD3 и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно объединяют с антителом против CD3. Иллюстративные средства, которые можно преимущественно объединять с антителом против CD3, включают без ограничения другие средства, которые связываются и/или активируют передачу сигналов CD3 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или средства, которые непосредственно не связываются с CD3, но, тем не менее, активируют или стимулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные способы комбинированного лечения и составов для совместного введения, включая антитела против CD3 по настоящему изобретению, описаны в другом месте в настоящем описании.

В еще одном аспекте изобретение относится к терапевтическим способам стимуляции активации Т-клеток с использованием антитела против CD3 или антигенсвязывающего участка антитела по изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по изобретению, нуждающемуся в этом индивидууму. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое нормализуют, улучшают, ингибируют или предотвращают посред-

ством стимуляции активности или передачи сигналов CD3.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD3 и антигеном-мишенью. Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы связываются с CD3 и CD20; в настоящем описании такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также обозначают как "биспецифические молекулы против CD3/CD20". Участок против CD20 биспецифической молекулы против CD3/CD20 является подходящим для направленной доставки в опухолевые клетки, которые экспрессируют CD20 (например, В-клеточные опухоли), и участок против CD3 биспецифической молекулы является пригодным для активации Т-клеток. Одновременное связывание CD20 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке облегчает направленный цитолиз (клеточный лизис) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой. Таким образом, биспецифические молекулы против CD3/CD20 по изобретению в числе прочего являются пригодными для лечения заболеваний и нарушений, связанных с опухолями, экспрессирующими CD20, или обусловленными ими (например, лимфом).

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному аспекту настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20. Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20 (например, биспецифическим антителам), где каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с переменной областью легкой цепи (LCVR). В определенных иллюстративных вариантах осуществления изобретения каждый антигенсвязывающий домен против CD3 и антигенсвязывающий домен против CD20 содержит различные, отличающиеся HCVR, спаренные с обычной LCVR. Например, как проиллюстрировано в примере 7 в настоящем описании, конструировали биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, где первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, получаемую из антитела против CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20, где второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, получаемую из антитела против CD20, спаренную с LCVR, получаемой из антитела против CD3 (например, такой же LCVR, которую вводят в антигенсвязывающий домен против CD3). Другими словами, в иллюстративных молекулах, описываемых в настоящем описании, спариванием HCVR из антитела против CD20 с LCVR из антитела против CD3 получают антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 (но не связывается с CD3). В таких вариантах осуществления первые и вторые антигенсвязывающие домены содержат различные HCVR антитела против CD3 и против CD20, но содержат общую LCVR антитела против CD3.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, как указано в табл. 1 или табл. 18. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, также может содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, как указано в табл. 1 или табл. 19. Согласно определенным вариантам осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1 или табл. 17. Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, как указано в табл. 1 или табл. 18, и/или любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи CDR1-CDR2-CDR3, как указано в табл. 1 или табл. 19.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1250, 1266, 1282, 1298, 1314 и 1329 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1258, 1274, 1290, 1306, 1322 и 1333, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1250/1258, 1266/1274, 1282/1290, 1298/1306, 1314/1322 и 1329/1333.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где

первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1256, 1272, 1288, 1304, 1320 и 1332 или по существу аналогичную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1264, 1280, 1296, 1312, 1328 и 1336 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1256/1264, 1272/1280, 1288/1296, 1304/1312, 1320/1328 и 1332/1336.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1252, 1268, 1284, 1300, 1316 и 1330 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1254, 1270, 1286, 1302, 1318 и 1331 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1260, 1276, 1292, 1308, 1324 и 1334 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности, и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1262, 1278, 1294, 1310, 1326 и 1335 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы против CD3/CD20 по изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1252-1254-1256-1260-1262-1264 (например, BS3/20-001); 1268-1270-1272-1276-1278-1280 (например, BS3/20-002); 1284-1286-1288-1292-1294-1296 (например, BS3/20-003); 1300-1302-1304-1308-1310-1312 (например, BS3/20-004); 1316-1318-1320-1324-1326-1328 (например, BS3-20-005) и 1330-1331-1332-1334-1335-1336 (например, BS3/20-007).

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1242, или по существу аналогичную ей последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1258, 1274, 1290, 1306, 1322 и 1333 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1242/1258, 1242/1274, 1242/1290, 1242/1306, 1242/1322 и 1242/1333.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1248 или по существу аналогичную ей последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1264, 1280, 1296, 1312, 1328 и 1336, или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается CD20, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1248/1264, 1248/1280, 1248/1296, 1248/1312, 1248/1328 и 1248/1336.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается CD20, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1244 или по существу аналогичную ей последовательность, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1246 или по существу аналогичную ей последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1260, 1276, 1292, 1308, 1324 и 1334 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности, и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1262, 1278, 1294, 1310, 1326 и 1335 или по существу аналогичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Определенные неограничивающие иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы против CD3/CD20 по изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается CD20, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1244-1246-1248-1260-1262-1264 (например, BS3/20-001); 1244-1246-1248-1276-1278-1280 (например, BS3/20-002); 1244-1246-1248-1292-1294-1296 (например, BS3/20-003); 1244-1246-1248-1308-1310-1312 (например, BS3/20-004); 1244-1246-1248-1324-1326-1328 (например, BS3-20-005) и 1244-1246-1248-1334-1335-1336 (например, BS3/20-007).

В родственном варианте осуществления изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается CD20, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в последовательностях варибельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1242/1258, 1242/1274, 1242/1290, 1242/1306, 1242/1322 и 1242/1333.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR биспецифических антигенсвязывающих молекул против CD3/CD20, описываемых в настоящем описании, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, указанные в табл. 20 и 21 в настоящем описании, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более полинуклеотидных последовательностей, указанных в табл. 20 и 21, в любом их функциональном сочетании или расположении. Также в изобретении предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, как и способы получения антител культивированием клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продукцию антител и выделение, продуцируемых антител.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, где любой из указанных выше антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с CD3, объединяют, присоединяют или иным образом связывают с любым из указанных выше антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с CD20, с получением биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывается с CD3 и CD20.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20 с модифицированным профилем гликозилирования. В некоторых применениях желательной может быть модификация для удаления нежелательных участков гликозилирования, или антитело, не содержащее группу фукозы, содержащуюся в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al., (2002) JBC, 277:26733). В других применениях модификацию можно проводить галактозилированием для модификации обусловленной компонентом цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против CD3/CD20, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно объединяют с биспецифической антигенсвязывающей молекулой против CD3/CD20. Иллюстративные средства, которые мож-



но преимущественно объединяет с биспецифической антигенсвязывающей молекулой против CD3/CD20, более подробно описаны в другом месте в настоящем описании.

В еще одном аспекте изобретение относится к терапевтическим способам направленной доставки/цитолитической опухоли клеток, экспрессирующих CD20, с использованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 по изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против CD3/CD20 по изобретению индивидууму.

Настоящее изобретение также относится к использованию биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 по изобретению в получении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией CD20 или обусловленного ей.

Другие варианты осуществления станут понятны при рассмотрении следующего ниже подробного описания.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлен объем опухоли (в мм<sup>3</sup>) в течение продолжительного периода времени у мышей NOD/SCID, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и PBMC, после имплантации опухоли и лечения, начиная на сутки имплантации опухоли, Fc человека (hFc, сплошная линия) или биспецифическим антителом CD3×CD20 (BS3/20-007, пунктирная линия).

На фиг. 2 представлен объем опухоли (в мм<sup>3</sup>) в течение продолжительного периода времени у мышей NOD/SCID, которым подкожно имплантировали смесь опухолевых клеток Raji и PBMC, после имплантации опухоли и лечения, начиная через 7 суток после имплантации опухоли, Fc человека (hFc, сплошная линия) или биспецифическим антителом CD3×CD20 (BS3/20-007, пунктирная линия).

На фиг. 3 представлен график количества В-клеток (×1000/мкл) в течение продолжительного периода времени в образцах крови от яванских макаков, которых обрабатывали тремя различными дозами биспецифического антитела BS3/20-001 (0,01, 0,1 или 1,0 мг/кг); контрольным антителом против CD20 в низкой дозе (контроль V, 0,01 мг/кг) или контрольным антителом против CD20 в высокой дозе (контроль III (1,0 мг/кг)).

На фиг. 4 представлен график количеств Т-клеток (×1000/мкл) в течение продолжительного периода времени в образцах крови от яванских макаков, которых обрабатывали тремя различными дозами биспецифического антитела BS3/20-001 (0,01, 0,1 или 1,0 мг/кг); контрольным антителом против CD20 в низкой дозе (контроль V, 0,01 мг/кг) или контрольным антителом против CD20 в высокой дозе (контроль III (1,0 мг/кг)).

На фиг. 5A, 5B, 5C и 5D представлены уровни (пг/мл) IFN-гамма, IL-2, IL-6 и TNF-альфа, соответственно, до дозирования и после дозирования у яванских макаков, которых обрабатывали однократной дозой BS3/20-001 (0,01, 0,1 или 1,0 мг/кг), контрольным антителом против CD20 в низкой дозе (0,01 мг/кг контроль V) или контрольным антителом против CD20 в высокой дозе (1,0 мг/кг контроль III).

На фиг. 6 представлен профиль экспрессии CD20 (выражаемый в кратном Log<sub>2</sub> изменению экспрессии), определяемый в образцах крови, получаемой в различные моменты времени у яванских макаков, которых обрабатывали контролем V 0,01 мг/кг (антитело против CD20); контролем III 1,0 мг/кг (антитело против CD20) и BS3/20-001 0,01, 0,1 и 1,0 мг/кг (биспецифическое антитело против CD3×CD20).

На фиг. 7 представлена общая концентрация в сыворотке (мкг/мл) биспецифического антитела против CD3×CD20 (BS3/20-001) в течение продолжительного периода времени в образцах крови у яванских макаков, которых обрабатывали 1,0 мг/кг (незакрашенные треугольники), 0,1 мг/кг (незакрашенные квадраты) или 0,01 мг/кг (незакрашенные ромбы) биспецифического антитела против CD3×CD20.

#### **Подробное описание**

Перед тем как настоящее изобретение описывают, следует понимать, что это изобретение не ограничено описываемыми конкретными способами и экспериментальными условиями, таким образом, способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология служит только для описания конкретных вариантов осуществления, и не подразумевают, что она является ограничивающей, т.к. объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Как используют в настоящем описании, термин "приблизительно", когда его используют по отношению к конкретному перечисляемому числовому значению, означает, что значение может отклоняться от перечисляемого значения не более чем на 1%. Например, как используют в настоящем описании, выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то, что в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описывают в настоящем описании, ниже описаны предпочтительные способы и вещества.

### Определения

Как используют в настоящем описании, экспрессия "CD3" относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках как часть мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (TCR) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованных ассоциацией двух из четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1370; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1371. В настоящем описании предполагают, что все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты относятся к варианту соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента человека, если явно не указано как происходящие от не являющихся человеком видов. Таким образом, выражение "CD3" означает CD3 человека, если явно не указано как происходящий от не являющихся человеком видов, например, "CD3 мыши", "CD3 обезьяны" и т.д.

Как используют в настоящем описании, "антитело, которое связывается с CD3" или "антитело против CD3" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну субъединицу CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон, и дзета/дзета). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связываться с растворимым CD3 и/или CD3, экспрессируемым на клеточной поверхности. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также рекомбинантные варианты белка CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, которые не содержат трансмембранный домен, или иным образом не связаны с клеточной мембраной.

Как используют в настоящем описании, выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" означает один или более белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, таким образом, что по меньшей мере часть белка CD3 экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и является доступной для антигенсвязывающего участка антитела. "Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" включает белки CD3, содержащиеся в функциональном Т-клеточном рецепторе в мембране клетки. Выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон, и дзета/дзета). Выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе на поверхности клетки без других типов цепей CD3. "Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" может содержать или состоят из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. Альтернативно, "экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" может содержать или состоят из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD3 человека на своей поверхности, но которую искусственно конструировали так, чтобы она экспрессировала CD3 на своей поверхности.

Как используют в настоящем описании, выражение "антитело против CD3" включает моновалентные антитела с одной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывается с CD3, и второе плечо, которое связывается со вторым (мишенью) антигеном, где плечо против CD3 содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 или табл. 18/19 в настоящем описании. Примеры биспецифических антител против CD3 описаны в другом месте в настоящем описании. Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в настоящем описании сокращенно обозначаемую как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем описании сокращенно обозначаемую как LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L1</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые определяющие комплементарность области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасные области (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела против CD3 (или его антигенсвязывающего участка) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут являться естественным образом или искусственно модифицированными. Консенсусную аминокислотную последовательность можно идентифицировать на основании анализа "бок-о-бок" двух или более CDR.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" также включает антигенсвязывающие

фрагменты целых молекул антител. Как используют в настоящем описании термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включает любой природный, получаемый ферментативно, синтетический или получаемый способами генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из целых молекул антител любыми подходящими стандартными способами, такими как протеолитическое расщепление или способы рекомбинантной генетической инженерии, включая манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и обрабатывать химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, получения остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Как используют в настоящем описании, выражение "антигенсвязывающий фрагмент" также включает другие конструируемые молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малых размеров (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или содержать любую композицию аминокислот и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или в рамке считывания с одной или более каркасных последовательностей. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V<sub>H</sub>, связанный с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно располагать относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H2</sub>; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H3</sub>; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H3</sub>; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub> и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны полной или неполной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые обуславливают гибкую или полугибкую связь между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, нековалентно связанный с одним другим и/или с одним или более мономерным доменом V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> (например, дисульфидной связью(ями)).

Как и в случае целой молекулы антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими).

Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифических антител, включая форматы иллюстративных биспецифических антител, описываемых в настоящем описании, можно адаптировать для использования в отношении антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению общепринятыми способами, доступными в данной области.

Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). "Обусловленная комплементом цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток, опосредованному антителом по изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточная цитотоксичность" (ADCC) относится к обусловленной клетками реакции, в которой неспецифи-

ческие цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связавшееся антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерять анализами, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337, и Clynes et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95:652-656). Константная область антитела является важной для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, можно выбирать изотип антитела в зависимости от того, является ли желательным, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В определенных вариантах осуществления антитела против CD3 по изобретению (моноспецифические или биспецифические) представляют собой антитела человека. Как используют в настоящем описании, термин "антитело человека" предназначен включать антитела, содержащие переменные и константные области, получаемые из последовательностей зародышевой линии человека иммуноглобулинов. Антитела человека по изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии человека иммуноглобулинов (например, мутации, вводимые случайным образом или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако как используют в настоящем описании, термин "антитело человека" не предназначен включать антитела, в которых последовательности CDR, получаемые из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, прививали на последовательности каркасной области человека.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Как используют в настоящем описании, термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен включать все антитела человека, которые получают, экспрессируют, конструируют или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделяемые из рекомбинанта, комбинаторная библиотека антител человека (дополнительно описано ниже), антитела, выделяемые у животного (например, мыши), которые являются трансгенными по отношению к генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, конструируемые или выделяемые другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, получаемые из последовательностей из зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или в случае, когда используют животное, трансгенное по отношению к последовательностям Ig человека, соматический мутагенез *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, несмотря на то, что их выделяют из последовательностей из зародышевой линии  $V_H$  и  $V_L$  человека, и они являются родственными им, не могут существовать в природе в зародышевом наборе антитела человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются межцепевой дисульфидной связью, связывающей тяжелые цепи. Во второй форме димеры не являются связанными межцепевыми дисульфидными связями, и образуется молекула приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (половины антитела). Выделение таких форм вызывало большое затруднение даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но ими не ограничивается, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Замена одной аминокислоты в шарнирной области IgG4 человека может значительно снижать вероятность появления второй формы (Angal et al., (1993) Molecular Immunology, 30:105) до уровней, как правило, наблюдаемых с использованием шарнирной области IgG1 человека. Настоящее изобретение включает антитела, содержащие одну или более мутаций в шарнирной области, области  $C_H2$  или  $C_H3$ , которые могут быть желаемыми, например, при получении для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по изобретению могут представлять собой выделенные антитела. Как используют в настоящем описании, "выделенное антитело" означает антитело, которое идентифицировали и выделили и/или отделили по меньшей мере от одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое отделили или удалили по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело в природе существует или естественным образом продуцируется, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело в рекомбинантной клетке *in situ*. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергали по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другие клеточное вещество и/или химические соединения.

Настоящее изобретение также относится к антителам с одним плечом, которые связываются с CD3. Как используют в настоящем описании, "антитело с одним плечом" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Антитела с одним плечом по настоящему изобретению могут содержать любые аминокислотные последовательности HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 или табл. 18/19 в настоящем описании.

Антитела против CD3, описываемые в настоящем описании, могут содержать одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых получали антитела. Такие мутации можно легко устанавливать путем сравнения аминокислотных последовательностей, описываемых в настоящем описании, с последовательностями, доступными зародышевой линии, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые получают из любой из аминокислотных последовательностей, описываемых в настоящем описании, где одну или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областей CDR подвергают мутации до соответствующего остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой получают антитело, или до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (в настоящем описании такие изменения последовательности совместно обозначают как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области на основании последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, описываемых в настоящем описании, может легко получать многие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их сочетания. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или остатки CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  подвергают мутации обратно до остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой получали антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают мутации обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутантные остатки, встречающиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутантные остатки, встречающиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области каркаса и/или остатков CDR подвергают мутации до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (например, последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно получали антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любое сочетание двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или областях CDR, например, где определенные отдельные остатки подвергают мутации до соответствующих остатков конкретной последовательности зародышевой линии, при этом определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (соответственно), пониженная иммуногенность и т.д. В настоящее изобретение включены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, получаемые таким общепринятым способом.

Настоящее изобретение также относится к антителам против CD3, содержащим варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описываемых в настоящем описании, содержащих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD3, содержащим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в табл. 1 в настоящем описании.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным антигенсвязывающим участком в переменной области молекулы антитела, известный как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован близко расположенными в пространстве аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичная" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотида с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), наблюдают идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере приблизительно в 95% и

более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измеряют любым хорошо известным алгоритмом определения идентичности последовательности, таким как FASTA, BLAST или Gap, как указано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, содержащий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность как полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Как применяют к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие пропуска по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, содержащим боковую группу (группу R) с аналогичными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). Как правило, консервативная аминокислотная замена по существу не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень схождения можно увеличивать для коррекции консервативного характера замены. Способы проведения такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, (1994) *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутаминат и (7) содержащие серу боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену с положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной у Gonnet et al., (1992) *Science*, 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любую замену с неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательности для полипептидов, которое также обозначают как идентичность последовательности, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белков подбирает сходные последовательности с использованием измерений схождения, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательности областей с наилучшим перекрытием между последовательностью запроса и последовательностью поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом для сравнения последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, в которой используют параметры по умолчанию. См., например, Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 и Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402.

#### **Биспецифические антигенсвязывающие молекулы**

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими к различным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.*, 22:238-244. Антитела против CD3 по настоящему изобретению можно связывать или совместно экспрессировать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент можно функционально связывать (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более других молекулярных структур, таких как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или полиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Использование выражения "антитело против CD3" в настоящем описании предназначено включать моноспецифические антитела против CD3, а также биспецифические антитела, содержащие связываю-

шееся с CD3 плечо и второе плечо, которое связывается с антигеном-мишенью. Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, где одно плечо иммуноглобулина связывается с CD3 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим для антигена-мишени. Антиген-мишень, с которым связывается другое плечо биспецифического антитела против CD3, может представлять собой любой антиген, экспрессируемый на клетке, ткани, органе, микроорганизме или вирусе или в непосредственной близости от них, против которого является желательным направленный иммунный ответ. Связывающееся с CD3 плечо может содержать любые аминокислотные последовательности HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 или табл. 18/19 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления связывающееся с CD3 плечо связывается с CD3 человека и индуцирует пролиферацию Т-клеток человека.

Касательно биспецифических антител по настоящему изобретению, где одно плечо антитела связывается с CD3, а другое плечо связывается с антигеном-мишенью, антиген-мишень может представлять собой опухолеассоциированный антиген. Неограничивающие примеры конкретных опухолеассоциированных антигенов включают, например, белки AFP, ALK, BAGE,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CCR5, CD19, CD20, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glypican-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE белки (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, белки ML-IAP, Mucl, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

Касательно биспецифических антител по настоящему изобретению, где одно плечо антитела связывается с CD3, а другое плечо связывается с антигеном-мишенью, антиген-мишень может представлять собой связанный с инфекционным заболеванием антиген. Неограничивающие примеры связанных с инфекционным заболеванием антигенов включают, например, антиген, который экспрессируется на поверхности вирусной частицы или, предпочтительно, экспрессируется на клетке, которая является инфицированной вирусом, где вирус выбран из группы, состоящей из ВИЧ, гепатита (А, В или С), вируса герпеса (например, HSV-1, HSV-2, CMV, HAV-6, VZV, вируса Эпштейна-Барра), аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, HTLV, вируса денге, вируса папилломы, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса JC и вируса арбовирусного энцефалита. Альтернативно, антиген-мишень может представлять собой антиген, который экспрессируется на поверхности бактерии или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая является инфицированной бактерией, где бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидии, риккетсии, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков, гонококков, клебсиеллы, протеус, серратии, псевдомонады, легионеллы, дифтерии, сальмонеллы, бациллы, бактерий холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспиры и болезни Лайма. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности гриба или, предпочтительно, экспрессируется на клетке, которая является инфицированной грибом, где гриб выбран из группы, состоящей из *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus* и т.д.), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и

*Histoplasma capsulatum*. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности паразитического организма или предпочтительно экспрессируется на клетке, которая является инфицированной паразитическим организмом, где паразитический организм выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps* и *Brugia malayi*.

Неограничивающие примеры конкретных патоген-ассоциированных антигенов включают, например, gp120 ВИЧ, CD4 ВИЧ, гликопротеин L гепатита В, гликопротеин М гепатита В, гликопротеин S гепатита В, гепатит С E1, гепатит С E2, специфический для гепатоцитов белок, gВ вируса простого герпеса, dВ цитомегаловируса и белок оболочки HTLV.

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связываются с CD3 и CD20. В настоящем описании такие молекулы могут быть обозначены, например, как биспецифические молекулы "против CD3/CD20" или "против CD3 $\times$ CD20" или "CD3 $\times$ CD20", или другой аналогичной терминологией.

Как используют в настоящем описании, термин "CD20" относится к белку CD20 человека, если не указано, как принадлежащий не являющимся человеком видам (например, "CD20 мыши", "CD20 обезья-

ны" и т.д.). Белок CD20 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1369.

Как используют в настоящем описании, выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарности области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одной или более дополнительных CDR и/или каркасных областей (FR), специфически связывается с конкретным антигеном. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определяют в другом месте в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, выражение "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий, по меньшей мере, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая отдельно или в комбинации с одной или более дополнительных CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с первым антигеном (например, CD3), и второй антигенсвязывающий домен специфически связывается со вторым отличным антигеном (например, CD20).

В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит варибельный домен тяжелой цепи (HCVR) и варибельный домен легкой цепи (LCVR). По отношению к биспецифической антигенсвязывающей молекуле, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифическое антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены с префиксом "A1", и CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены с префиксом "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначать в настоящем описании как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначать в настоящем описании как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен можно непосредственно или опосредованно соединять друг с другом с получением биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Альтернативно, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена можно соединять с отдельным мультимеризующим доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, таким образом, образуя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Как используют в настоящем описании, "мультимеризующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая обладает способностью образовывать связь со вторым мультимеризующим доменом такой же или сходной структуры или строения. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина. Неограничивающий пример мультимеризующего компонента представляет собой Fc-участок иммуноглобулина (содержащий домен C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3), например Fc IgG, выбранного из изомеров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой группе изомеров.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, как правило, содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых представляет собой индивидуальную часть отдельной тяжелой цепи антитела. Первые и второе мультимеризующие домены могут принадлежать одному и тому же изотипу IgG, такому как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимеризующие домены могут принадлежать различным изотипам IgG, таким как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

В определенных вариантах осуществления мультимеризующий домен представляет собой фрагмент Fc или аминокислотную последовательность длиной от 1 приблизительно до 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий содержащий цистеин пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейцинов застежки, мотива спираль-петля или мотива суперспираль.

Любой формат или технологию биспецифического антитела можно использовать для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Например, для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы антитело или его фрагмент, обладающий первой специфичностью связывания антигена, можно функционально связывать (например, посредством химического связывания, генетического слияния, образования нековалентных связей или иным образом) с одной или более других молекулярных структур, таких как другое антитело или фрагмент антитела, обладающий второй антигенсвязывающей специфичностью. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, (DVD)-Ig с двойным варибельным доменом, квадрому, выступы во впадины, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами во впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, (DAF)-IgG с Fab двойного действия и биспецифические форматы Mab2 (для обзора



указанных выше форматов см., например, Klein et al., 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки).

Касательно биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению мульти-меризующие домены, например домены Fc, могут содержать одну или более аминокислотных замен (например, вставок, делеций или замен) по сравнению с природным вариантом домена Fc дикого типа. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в домене Fc, которые приводят к модифицированному домену Fc с модифицированным связывающим взаимодействием (например, увеличенным или уменьшенным) между Fc и FcRn. В одном из вариантов осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, где модификация увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне приблизительно от 5,5 приблизительно до 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый домен C<sub>H</sub>3 и второй домен C<sub>H</sub>3 Ig, где первый и второй домены C<sub>H</sub>3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере отличие на одну аминокислоту приводит к уменьшению связывания биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим отличие в аминокислотах. В одном из вариантов осуществления первый домен C<sub>H</sub>3 Ig связывается с белком А и второй домен C<sub>H</sub>3 Ig содержит мутацию, которая снижает или нарушает связывание с белком А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C<sub>H</sub>3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут встречаться во втором C<sub>H</sub>3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2, и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

В определенных вариантах осуществления домен Fc может быть химерным, объединяющим последовательности Fc, получаемые из более чем одного изотипа иммуноглобулинов. Например, химерный домен Fc может содержать часть или полную последовательность C<sub>H</sub>2, получаемую из области C<sub>H</sub>2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или полную последовательность C<sub>H</sub>3, получаемую из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный домен Fc также может содержать химерную шарнирную область. Например, химерная шарнирная область может содержать последовательность "верхней шарнирной области", получаемую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, объединенную с последовательностью "нижней шарнирной области", получаемой из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного домена Fc, который можно вводить в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит от N- до C-конца: [C<sub>H</sub>1 IgG4] [верхнюю шарнирную область IgG4]-[нижнюю шарнирную область IgG2]-[CH2 IgG4]-[CH3 IgG4]. Другой пример химерного домена Fc, который можно вводить в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит от N- до C-конца: [C<sub>H</sub>1 IgG1]-[верхнюю шарнирную область IgG1]-[нижнюю шарнирную область IgG2]-[CH2 IgG4]-[CH3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые можно вводить в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в предварительной заявке США № 61/759578, зарегистрированной 1 февраля 2013 года. Химерные домены Fc, содержащие такие общие структуры и их варианты, могут характеризоваться измененным связыванием с рецептором Fc, что в свою очередь влияет на эффекторную функцию Fc.

#### Варианты последовательности

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать одну или более замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых получали отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко устанавливать путем сравнения аминокислотных последовательностей, описываемых в настоящем описании, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получают из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, описываемых в настоящем описании, где одна или

более аминокислот в одной или более каркасных областей и/или областей CDR подвергают мутации до соответствующего остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой получали антитело, или до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (в настоящем описании такие изменения последовательности совокупно обозначают как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области на основании последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей, описываемых в настоящем описании, может легко получать многие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индивидуальных мутацией зародышевой линии или их сочетания. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или области CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  подвергают обратной мутации до остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой изначально получали антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают обратной мутации до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутантные остатки, встречающиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутантные остатки, встречающиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или области CDR подвергают мутации до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (например, последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально получали антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или области CDR, например, где определенные отдельные остатки подвергают мутации до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, при этом определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать на одно или более желаемое свойство, такой как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (соответственно), пониженная иммуногенность и т.д. В настоящее изобретение включены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, получаемых таким общепринятым способом.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам, где один или оба антигенсвязывающих доменов содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описываемых в настоящем описании, содержащих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, описываемых в настоящем описании. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) с аналогичными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). Как правило, консервативная аминокислотная замена по существу не изменяет функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислоты, которые содержат боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутаминат, и (7) содержащие серу боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену с положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной у Gonnet et al., (1992) Science, 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любую замену с неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая является по существу идентичной любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описываемых в настоящем описании. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" в отношении аминокислотной последовательности означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие пропуска по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно положения остатка, которые не являются идентичными, отличаются кон-

сервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства можно увеличивать для коррекции консервативного характера замены. Способы проведения такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, (1994) *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-331.

Сходство последовательности для полипептидов, которое также обозначают как идентичность последовательности, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белков подбирает сходные последовательности с использованием измерений сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательности областей с наилучшим перекрытием между последовательностью запроса и последовательностью поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом для сравнения последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, в которой используют параметры по умолчанию. См., например, Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 и Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402.

#### **pH-зависимое связывание**

Настоящее изобретение относится к антителам против CD3 и биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20 с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело против CD3 по настоящему изобретению может обладать сниженным связыванием с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, антитела против CD3 по изобретению могут обладать повышенным связыванием с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH менее приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Как используют в настоящем описании, выражение "нейтральный pH" означает pH приблизительно от 7,0 приблизительно до 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В определенных случаях выражение "пониженное связывание... при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" используют для отношения значения  $K_D$  связывания антитела со своим антигеном при кислом pH к значению  $K_D$  связывания антитела со своим антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, для целей настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как обладающий "сниженным связыванием с CD3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH", если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает отношением  $K_D$  в кислой/нейтральной среде приблизительно 3,0 или более. В определенных иллюстративных вариантах осуществления отношение  $K_D$  в кислой/нейтральной среде для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получать, например, скринингом популяции антител на сниженной (или повышенной) связывание с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут приводить к антителам с pH-зависимыми характеристиками. Например, заменой одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) на остаток гистидина можно получать антитело с пониженным связыванием с антигеном при кислом pH относительно нейтрального pH. Антитела, содержащие варианты Fc

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам против CD3 и биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, содержащим домен Fc, содержащий одну или более мутаций, которые повышают или понижают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 домена Fc, где мутация(и) увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне приблизительно от 5,5 приблизительно до 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полувыведения антитела из сыворотки, когда его вводят животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например,

S/R/Q/E/D или T) или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S), модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F), модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y), модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E), модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD3 и биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, содержащим домен Fc, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В объеме настоящего изобретения предусматривают все возможные сочетания указанных выше мутаций в домене Fc и других мутаций в антитело-вариабельных доменах, описываемых в настоящем описании.

#### **Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул**

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 человека и индуцируют пролиферацию Т-клеток. Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD3, которые индуцируют пролиферацию Т-клеток человека при значении  $EC_{50}$  менее приблизительно 0,33 пМ, как измеряют анализом пролиферации Т-клеток *in vitro*, например с использованием форматов анализа, как определено в примере 4 в настоящем описании (например, оценивая пролиферацию клеток Jurkat или PBMC человека в присутствии антител против CD3), или по существу аналогичным анализом. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению индуцируют пролиферацию Т-клеток человека (например, пролиферацию клеток Jurkat и/или пролиферацию PBMC) при значении  $EC_{50}$  менее приблизительно 0,32 пМ, менее приблизительно 0,31 пМ, менее приблизительно 0,30 пМ, менее приблизительно 0,28 пМ, менее приблизительно 0,26 пМ, менее приблизительно 0,24 пМ, менее приблизительно 0,22 пМ или менее приблизительно 0,20 пМ, как измеряют анализом пролиферации Т-клеток *in vitro*, например с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в настоящем описании, или по существу аналогичным анализом.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 человека и индуцируют опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток. Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD3, которые индуцируют опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток при  $EC_{50}$  менее приблизительно 2,3 пМ, как измеряют в анализе опосредованного Т-клетками цитолиза опухолевых клеток *in vitro*, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 6 в настоящем описании (например, оценивая степень цитолиза опухолевых клеток U937 PBMC человека в присутствии антител против CD3), или по существу аналогичным анализом. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению индуцируют опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток (например, опосредованный PBMC цитолиз клеток U937) при значении  $EC_{50}$  менее приблизительно 2,3 пМ, менее приблизительно 2,2 пМ, менее приблизительно 2,1 пМ, менее приблизительно 2,0 пМ, менее приблизительно 1,8 пМ, менее приблизительно 1,6 пМ, менее приблизительно 1,4 пМ, менее приблизительно 1,2 пМ, менее приблизительно 1,0 пМ, менее приблизительно 0,8 пМ, менее приблизительно 0,6 пМ или менее приблизительно 0,5 пМ, как измеряют анализом опосредованного Т-клетками цитолиза опухолевых клеток *in vitro*, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 6 в настоящем описании, или по существу аналогичным анализом.

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 человека с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных свойств направленного воздействия, которые являются желательными. Например, касательно биспецифической антигенсвязывающей молекулы, где одно плечо связывается с CD3, а другое плечо связывается с антигеном-мишенью (например, CD20), желательным может являться связывание связывающегося с антигеном-мишенью плеча с антигеном-мишенью с высокой аффинностью, при этом плечо против CD3 связывается с CD3 только с умеренной или низкой аффинностью. Таким образом, можно получать предпочтительное направленное воздействие антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, при этом устраняя общее/нецелевое связывание с CD3 и последующие неблагоприятные побочные эффекты, связанные с ним.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связываются с CD3 человека (например, при 25°C) с  $K_D$  менее приблизительно 15 нМ, как измеряют поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению

связываются с CD3 с  $K_D$  менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 800 пМ, менее приблизительно 600 пМ, менее приблизительно 500 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 300 пМ, менее приблизительно 200 пМ, менее приблизительно 180 пМ, менее приблизительно 160 пМ, менее приблизительно 140 пМ, менее приблизительно 120 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 80 пМ, менее приблизительно 60 пМ, менее приблизительно 40 пМ, менее приблизительно 20 пМ, или менее приблизительно 10 пМ, как измеряют поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или по существу аналогичным анализом.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD3 с полупериодом диссоциации ( $t^{1/2}$ ) более приблизительно 10 мин, как измеряют поверхностным плазмонным резонансом при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании, или по существу аналогичным анализом. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD3 с  $K_M$  более приблизительно 20 мин, более приблизительно 30 мин, более приблизительно 40 мин, более приблизительно 50 мин, более приблизительно 60 мин, более приблизительно 70 мин, более приблизительно 80 мин, более приблизительно 90 мин, более приблизительно 100 мин, более приблизительно 200 мин, более приблизительно 300 мин, более приблизительно 400 мин, более приблизительно 500 мин, более приблизительно 600 мин, более приблизительно 700 мин, более приблизительно 800 мин, более приблизительно 900 мин, более приблизительно 1000 мин или более приблизительно 1200 мин, как измеряют поверхностным плазмонным резонансом при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или по существу аналогичным анализом.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам (например, биспецифическим антителам), которые способны одновременно связываться с CD3 человека и CD20 человека. Согласно определенным вариантам осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению специфически взаимодействуют с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или CD20. Величину, с которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывается с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или CD20, можно оценивать посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 8 в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связываются с линиями Т-клеток человека, которые экспрессируют CD3, но не CD20 (например, Jurkat), линиями В-клеток человека, которые экспрессируют CD20, но не CD3 (например, Raji), и/или Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови [PBMC] яванского макака). Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с любыми из указанных выше клеток и линий клеток со значением  $EC_{50}$  приблизительно от  $9,0 \times 10^{-6}$  приблизительно до  $2,0 \times 10^{-9}$ , или менее, как определяют с использованием анализа FACS, как указано в примере 8, или по существу аналогичным анализом.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, которые связываются с экспрессирующими CD3 Т-клетками человека (например, Jurkat) со значением  $EC_{50}$  в диапазоне от 1,0 пМ до 1000 нМ. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы против CD3/CD20 связываются с экспрессирующими CD3 Т-клетками человека со значением  $EC_{50}$  в диапазоне от 1 до 60 нМ. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, которые связываются с экспрессирующими CD3 Т-клетками человека (например, Jurkat) со значением  $EC_{50}$  приблизительно 1 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 2 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 20 нМ, приблизительно 30 нМ, приблизительно 40 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 60 нМ, приблизительно 70 нМ, приблизительно 80 нМ, приблизительно 90 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 300 нМ, приблизительно 500 нМ, приблизительно 800 нМ, приблизительно 1000 нМ или более.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, которые обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из: (a) индукции пролиферации PBMC *in vitro* (см., например, пример 9 в настоящем описании); (b) активации Т-клеток, индукции выделения IFN-гамма и увеличение экспрессии CD25 в цельной крови человека (см., например, пример 10 в настоящем описании); (c) индукции опосредованной Т-клетками цитотоксичности на устойчивых к антителам против CD20 линиях клеток (см., например, пример 11 в настоящем описании); (d) индукции цитотоксичности на В-клетках человека (например, Raji; см., например, пример 13 в настоящем описании); (e) истощении В-клеток (например, CD19+ В-клеток) у мыши с восстановленным иммунитетом клетки человека иммунитетом (см., например, пример 14 в настоящем описании), и (f) уменьшение объема В-клеточной опухоли (например, объема опухоли Raji) в ксенотранс-

плантатах мышей (см., например, пример 15).

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, которые способны подавлять В-клетки у индивидуума (см., например, пример 16). Например, определенные варианты осуществления относятся к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, где однократное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы индивидууму (например, в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг или менее) вызывает снижение числа В-клеток у индивидуума (например, в образце крови, получаемом у индивидуума) ниже детектируемых уровней. В определенных вариантах осуществления однократное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 в дозе приблизительно 0,1 мг/кг вызывает снижение числа В-клеток у индивидуума ниже детектируемых уровней приблизительно на 7 суток, приблизительно на 6 суток, приблизительно на 5 суток, приблизительно на 4 суток, приблизительно на 3 суток, приблизительно на 2 суток или приблизительно на 1 сутки после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы индивидууму. Согласно определенным вариантам осуществления однократное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 по изобретению в дозе приблизительно 0,01 мг/кг приводит к тому, что число В-клеток остается ниже детектируемых уровней по меньшей мере до приблизительно 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток, 17 суток или более после введения. Как используют в настоящем описании выражение "ниже детектируемых уровней" означает, что не возможно непосредственно или опосредованно детектировать В-клетки в образце крови, получаемом у индивидуума, с использованием стандартных анализов детекции В-клеток, например, анализа FACS для В-клеточных маркеров, как указано в примере 16 в настоящем описании.

Родственные варианты осуществления относятся к биспецифической антигенсвязывающей молекуле против CD3/CD20, где число В-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума начиная приблизительно с 1 суток приблизительно по 28 суток после введения однократной дозы приблизительно 0,01 мг/кг антигенсвязывающей молекулы индивидууму, составляет менее 25% от числа В-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума до введения. Другие определенные варианты осуществления относятся к биспецифической антигенсвязывающей молекуле против CD3/CD20, где число В-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума начиная приблизительно с 1 суток приблизительно по 56 суток после введения однократной дозы приблизительно 0,01 мг/кг антигенсвязывающей молекулы индивидууму, составляет менее 50% от числа В-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума до введения.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против CD3/CD20, которые при введении индивидууму вызывают только временное снижение числа Т-клеток. Например, предоставлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы против CD3/CD20, которые при введении индивидууму в дозе приблизительно 0,01 мг/кг вызывают снижение числа Т-клеток на 1 сутки после введения, но где число Т-клеток в микролитре крови восстанавливается в последующие моменты времени (например, приблизительно на 2 суток, 7 суток, 14 суток, 28 суток, 42 суток, 56 суток или позже после введения). Например, настоящее изобретение относится к биспецифической антигенсвязывающей молекуле против CD3/CD20, где число Т-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума начиная приблизительно с 14 суток по приблизительно 56 суток после введения антигенсвязывающей молекулы индивидууму в дозе приблизительно 0,01 мг/кг, является равным или больше числа Т-клеток в микролитре крови, получаемой у индивидуума до введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Картирование эпитопов и родственные способы Эпитоп на CD3, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD3. Альтернативно, эпитоп может состоять из ряда несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3. Антитела по изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма) или могут взаимодействовать с аминокислотами в двух или более различных цепях CD3. Как используют в настоящем описании термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован близко расположенными в пространстве аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Для определения, "взаимодействует ли с одной или более аминокислот" антигенсвязывающий домен антитела в полипептиде или белке, можно использовать различные способы, известные специали-

стам в данной области. Иллюстративные способы включают, например, общепринятый перекрестный конкурентный анализ, такой как анализ, описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ на основе сканирования аланином, анализ пептидных блогов (Reineke, 2004, *Methods Mol. Biol.*, 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно применять способы, такие как вырезание эпитопа, удаление эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science*, 9:487-496). Другой способ, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, представляет собой замену водород/дейтерий, детектируемую масс-спектрометрией. Как правило, термин способ замены водород/дейтерий включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием с антителом к меченому дейтерием белку. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду для обеспечения возможности замены водород-дейтерий во всех остатках за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечены дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом, выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry*, 267(2):252-259; Engen and Smith, (2001) *Anal. Chem.*, 73:256A-265A. С целью картирования эпитопов также можно использовать рентгеноструктурную кристаллографию комплекса антиген/антитело.

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителам против CD3, которые связываются с одним и тем же эпитопом, как любое из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем описании (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 1 в настоящем описании). Аналогично, настоящее изобретение также относится к антителам против CD3, которые конкурируют за связывание с CD3 с любым из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем описании (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 1 в настоящем описании).

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 человека, где первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3 как любой из конкретных иллюстративных специфических к CD3 антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании, и/или где второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD20 как любой из конкретных иллюстративных специфических к CD20 антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании.

Аналогично настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 человека, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных иллюстративных специфических к CD3 антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании и/или где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD20 с любым из конкретных иллюстративных специфических к CD20 антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании.

Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или его антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению общепринятыми известными в данной области способами. Например, для определения, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на CD3 (или CD20) как и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, сначала обеспечивают возможность связывания эталонной биспецифической молекулы с белком CD3 (или белком CD20). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой CD3 (или CD20). Если тестируемое антитело способно связываться с CD3 (или CD20) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом CD3 (или CD20) чем эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой CD3 (или CD20) после насыщающегося связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD3 (или CD20), как и эпитоп, с которым связывается эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по изобретению. Затем можно проводить дополнительное общепринятое экспериментирование (например, анализы мутации пептидов и связывания) для подтверждения того, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела фактически обусловлено связыванием с тем же эпитопом, как и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, или отсутствие наблюдаемого связывания обусловлено пространственным блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого рода можно проводить с использованием ELISA, RIA, Вiasoge, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антителом, доступного в данной области. В соответствии с определенными вариантами настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка

связываются с тем же (или перекрывающимся) эпитопом если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измеряют в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.*, 1990:50:1495-1502). Альтернативно, полагают, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или предотвращают связывание одного антигенсвязывающего белка уменьшает или предотвращает связывание другого. Полагают, что два антигенсвязывающих белка имеют "перекрывающиеся эпитопы", только в случае, когда подгруппа мутаций аминокислоты, которая уменьшает или предотвращает связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшает или предотвращает связывание другого.

Для определения, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, проводят описанный выше способ связывания в двух направлениях: в первом направлении обеспечивают возможность связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с белком CD3 (или белком CD20) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD3 (или CD20). Во втором направлении обеспечивают связывание тестируемого антитела с молекулой CD3 (или CD20) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD3 (или CD20). Если в обоих направлениях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD3 (или CD20), то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD3 (или CD20). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, может необязательно связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, а может пространственно блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания с перекрывающимся или смежным эпитопом.

#### **Получение антигенсвязывающих доменов и конструкция биспецифических молекул**

Антигенсвязывающие домены, специфические к конкретным антигенам можно получать любой известной в данной области технологией получения антител. После получения два различных антигенсвязывающих домена, специфических к двум различным антигенам (например, CD3 и CD20), можно соответствующим образом располагать относительно друг друга с получением биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с использованием общепринятых способов. (Обсуждение форматов иллюстративных биспецифических антител, которые можно использовать для конструкции биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, предоставлено в другом месте в настоящем описании). В определенных вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (например, тяжелые и легкие цепи) полиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению получают из химерных, гуманизированных или полностью принадлежащих человеку антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно получать с использованием технологии VELOCIMMUNE™. При использовании технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения антител человека) сначала выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к конкретному антигену (например, CD3 или CD20), содержащие переменную область человека и константную область мыши. Антитела подвергают характеристизации и отбору в зависимости от желаемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека с получением полностью принадлежащих человеку тяжелых и/или легких цепей, которые можно вводить в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению.

Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул человека можно использовать генетических животных, получаемых способами генетической инженерии. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна к перестройке и экспрессии эндогенной переменной последовательности легкой цепи иммуноглобулина мыши, где мышь экспрессирует только один или два переменных домена легких цепей человека, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном константной области каппа-цепи мыши в эндогенном локусе каппа-цепи мыши. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью принадлежащих человеку биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две различные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит переменный домен, получаемый из одного из двух различных сегментов гена переменной области легкой цепи человека. (См., например, US 2011/0195454 для подробного обсуждения таких модифицированных мышей и их использования для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул).

#### **Биоэквиваленты**

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей иллюстративных молекул, описы-



ваемых в настоящем описании, но которые сохраняют способность связываться с CD3 и/или CD20. Такие варианты молекул могут содержать одну или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но обладают биологической активностью, которая является по существу эквивалентной биологической активности желаемых биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые являются биоэквивалентными любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании. Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, для скорости и степень всасывания которых не демонстрируют значимого отличия при введении в аналогичной молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях в однократной дозе или многократной дозе. Некоторые антигенсвязывающие белки считают эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными в отношении степени всасывания, но не по скорости всасывания, и их все еще можно считать биоэквивалентными, т.к. такие различия скорости всасывания являются планируемыми и отражены в мнении, не являются существенными для достижения эффективной концентрации лекарственных средств в организме, например, при длительном использовании, и считаются не существенными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не наблюдают значительных различий с клинической точки зрения в их безопасности, чистоте и активности.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если можно переводит пациента один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска неблагоприятного действия, включая клинически значимое изменение иммуногенности, или пониженной эффективности по сравнению с непрерывное терапией без такого перевода.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий использования в тех случаях, когда известны такие механизмы.

Биоэквивалентность можно демонстрировать способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, у которых измеряют концентрацию антител или их метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, для которого установили корреляцию и по которому можно обосновано прогнозировать данные биодоступности у человека *in vivo*; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, у которых измеряют соответствующее кратковременное фармакологическое действие антитела (или его мишени) в зависимости от времени, и (d) в строго контролируемом клиническом испытании, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, можно конструировать, например, получая различные замены остатков или последовательностей или удаляя концевые или внутренние остатки или последовательности, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, можно удалять или заменять другими аминокислотами для предотвращения образования излишних или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержащих аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые предотвращают или устраняют гликозилирование.

#### **Видовая избирательность и видовая перекрестная реактивность**

Определенные варианты осуществления изобретения относятся к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD3 человека, но не связываются с CD3 от других видов. Также предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD20, но не с CD20 от других видов. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD3 человека и с CD3 от одного или более не являющихся человеком видов, и/или к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD20 человека и с CD20 от одного или более не являющихся человеком видов.

Определенные иллюстративные варианты осуществления изобретения относятся к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD3 человека и/или CD20 человека и могут связываться или не связываться, соответственно, с одним или более CD3 и/или CD20 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резус или шимпанзе. Например, конкретный иллюстративный вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 человека.

### Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, конъюгированным с терапевтическими молекулами, ("иммуноконъюгатам"), такими как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммуносупрессор или радиоактивный изотоп. Цитотоксические средства включают любое средство, которое является вредным для клеток. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для получения иммуноконъюгатов известны в данной области (см. например, WO 05/103081).

### Терапевтический состав и введение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению формулируют с подходящими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Большое число соответствующих составов можно найти в справочнике, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Также см. Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA, (1998) J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, может изменяться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. В случае, когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению используют для терапевтических целей у взрослого пациента, предпочтительным может быть внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе приблизительно от 0,01 приблизительно до 20 мг/кг масса тела, более предпочтительно приблизительно от 0,02 приблизительно до 7, приблизительно от 0,03 приблизительно до 5 или приблизительно от 0,05 приблизительно до 3 мг/кг масса тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно регулировать. Эффективные дозы и схемы дозирования для введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять эмпирически, например, можно наблюдать за течением болезни у пациента посредством периодической оценки и таким образом регулировать дозы. Кроме того, межвидовые схемы дозирования можно проводить хорошо известными способами в данной области (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res., 8:1351).

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432). Способы введения включают, но ими не ограничиваются, интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым подходящим путем, например посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с использованием стандартной иглы и шприца. Кроме того, касательно подкожной доставки средство доставки в виде ручки легко находит применение в доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое средство доставки в виде ручки может быть подходящим для повторного использования или одноразовым. Пригодное для повторного использования средство доставки в виде ручки, как правило, используют сменным картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как ввели всю фармацевтическую композицию внутри картриджа, и картридж является пустым, пустой картридж можно легко снимать и заменять новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем средство доставки в виде ручки можно повторно использовать. В одноразовом средстве доставки в виде ручки не содержится сменного картриджа. Наоборот одноразовое средство доставки в виде ручки поступает предварительно наполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре в устройстве. После того, как резервуар освобождают от фармацевтической композиции, все устройство можно выкидывать.

Многие подходящие для повторного использования средства доставки в виде ручек и автоинжекторов находят применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, но ими не ограничиваются, например, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Indianapolis, IN),

NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany). Примеры одноразовых средств доставки в виде ручки, находящих применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но ими не ограничиваются, например ручку SO-LOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURE-CLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные вещества; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно помещать в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, необходимой является только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенной, подкожной, внутрикожной и внутримышечной инъекций, капельных введений и т.д. Такие инъекционные препараты можно получать общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно получать, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанной выше, в стерильной водной среде или масляной среде общепринятой используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций можно привести, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизатором, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) продукт присоединения гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизатором, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Получаемой таким образом инъекцией, предпочтительно, наполняют подходящую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования, описанного выше, получают в лекарственных формах в стандартной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося указанного выше антитела, как правило, составляет приблизительно от 5 приблизительно до 500 мг в лекарственной форме в стандартной дозе; в частности, в форме инъекции, предпочтительно, чтобы указанное выше антитело содержалось в количестве приблизительно от 5 приблизительно до 100 мг и приблизительно от 10 приблизительно до 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул Настоящее изобретение относится к способам, включающим введение индивидууму терапевтической композиции, содержащей антитело против CD3 или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с CD3 и антигеном-мишенью (например, CD20). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Как используют в настоящем описании, выражение "нуждающийся в этом индивидуум" означает человека или не являющееся человеком животное, которое проявляет один или более симптомов или признаков злокачественной опухоли (например, индивидуум, у которого выявляют опухоль, или страдающий от любой из злокачественных опухолей, указанных в настоящем описании ниже), или того, кто иным образом получит благоприятное действие от ингибирования или снижения активности CD20 или уменьшения числа CD20+ В-клеток.

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) являются пригодными в числе прочего для лечения любого заболевания или нарушения, при котором стимуляция, активация и/или направление иммунного ответа будет благоприятным. В частности, биспецифические антигенсвязывающие молекулы против CD3/CD20 по настоящему изобретению можно использовать для лечения, профилактики и/или улучшения состояния любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией CD20 или активностью или пролиферацией В-клеток CD20+. Механизм действия, посредством которого получают терапевтические способы по изобретению, включает цитоллиз клеток, экспрессирующих CD20, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза, или посредством сочетания двух или более таких механизмов. Экспрессирующие CD20 клетки, которые можно ингибировать или уничтожать с использованием биспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению, включают,

например, туморогенные В-клетки.

Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению можно использовать для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и оболочках головного мозга, ротоглотке, легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских половых, мышце, кости, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, образующих кровь клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, и специализированных органах чувств, таких как глаз. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению используют для лечения одной или более из следующих ниже злокачественных опухолей: почечноклеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с увеличением MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы или меланомы. Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению используют для лечения В-клеточной злокачественной опухоли (например, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы [NHL], лимфобластного лейкоза/лимфомы из предшественников В-клеток, неоплазий зрелых В-клеток, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфомы, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, лимфомы мантийных клеток, фолликулярной лимфомы, кожной фолликулярной центральной лимфомы, лимфомы из В-клеток маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, плазмоцитомы, плазматической миеломы, посттрансплантационных лимфолиферативных нарушений, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы).

Согласно определенным вариантам настоящего изобретения антигенсвязывающие молекулы могут подходить для лечения пациента, страдающего В-клеточной лимфомой (например, NHL), которая является устойчивой или неполностью реагирующей на терапию только антителами против CD20 (например, устойчивой к терапии ритуксимабом). Другие родственные варианты осуществления изобретения относятся к способам, включающим введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20, как описано в настоящем описании, пациенту, который страдает В-клеточной лимфомой (например, NHL), которая является рефрактерной к терапии антителами против CD20 (например, пациенту с рефрактерной к ритуксимабу опухолью или с рецидивирующей или рефрактерной В-клеточной лимфомой). Для определения, страдает ли пациент такой опухолью, которая является устойчивой, неполностью реагирующей или рефрактерной к терапии только антителами против CD20, можно использовать известные в данной области аналитические способы и способы диагностики, такие как сканирование опухоли и т.д.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения остаточной злокачественной опухоли у индивидуума. Как используют в настоящем описании, термин "остаточная злокачественная опухоль" означает существование или персистенцию одной или более злокачественных клеток у индивидуума после лечения терапией против злокачественной опухоли.

Согласно определенным аспектам настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией CD20 (например, В-клеточной лимфомы), включающим введение одной или более биспецифических антигенсвязывающих молекул, описываемых в другом месте в настоящем описании, индивидууму после того, как индивидуум получал монотерапию антителами против CD20 (например, после введения фармацевтической композиции, содержащей антитело против CD20, такое как ритуксимаб). Например, настоящее изобретение относится к способам лечения В-клеточной лимфомы, включающим введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы против CD3/CD20 пациенту через 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как индивидуум получал монотерапию антителами против CD20 (например, лечение ритуксимабом или эквивалентное ему лечение). В других аспектах индивидууму сначала вводят биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по изобретению (биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против CD3/CD20), содержащую домен Fc IgG4, в один или более моментов времени (например, для обеспечения устойчивого первичного снижения числа В-клеток) с последующим введением эквивалентной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей другой домен IgG, такой как домен Fc IgG1, в последующие моменты времени.

#### **Способы комбинированного лечения и составы**

Настоящее изобретение относится к способам, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любое из иллюстративных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описываемых в настоящем описании, в комбинации с одним или более дополнительных терапевтических средств.

Иллюстративные дополнительные терапевтические средства, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, включают, на-

пример, антагонист EGFR (например, антитело против EGFR [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефинитиб или эрлотиниб]), антагонист другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитело против ErbB2, ErbB3 или ErbB4 или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывается с EGFRvIII), антагонист cMET (например, антитело против cMET), антагонист IGF1R (например, антитело против IGF1R), ингибитор V-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- $\alpha$  (например, антитело против PDGFR- $\alpha$ ), ингибитор PDGFR- $\beta$  (например, антитело против PDGFR- $\beta$ ), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, см., например, US 7087411 (также обозначаемый в настоящем описании как "ингибирующий VEGF слитый белок"), антитело против VEGF (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, антитело против DLL4, раскрытое в US 2009/0142354, такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, антитело против Ang2, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (например, антитело против FOLH1), антагонист PRLR (например, антитело против PRLR), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, антитело против STEAP1 или антитело против STEAP2), антагонист TMRSS2 (например, антитело против TMRSS2), антагонист MSLN (например, антитело против MSLN), антагонист CA9 (например, антитело против CA9), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина), одновалентный антагонист CD20 (например, одновалентное антитело против CD20, такое как ритуксимаб) и т.д. Другие средства, которые можно эффективно вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами по изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 или их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против CD3/CD20, как описано в настоящем описании) также можно вводить как часть схемы лечения, предусматривающего введение одной или более терапевтических комбинаций, выбранных из "ICE": ифосфамида (например, Ifex®), карбоплатина (например, Paraplatin®), этопозида (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": дексаметазона (например, Decadron®), цитарабина (например, Cytosar-U®, цитозинарабинозида, ara-C), цисплатина (например, Platinol®-AQ), и "ESHAP": этопозида (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолона (например, Medrol®), цитарабина в высоких дозах, цисплатина (например, Platinol®-AQ).

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим комбинациям, содержащим любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, V-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из указанных выше цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, нанотело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, фрагмент Fd, фрагмент Fv, scFv, фрагмент dAb, или другие конструируемые молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить и/или совместно формулировать в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или NSAID.

Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также предусматривает лечение облучением и/или общепринятую химиотерапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно или непосредственно после введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению (для целей настоящего описания такие схемы введения рассматривают как введение антигенсвязывающей молекулы "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению вводят совместно с одним или более дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в другом месте в настоящем описании.

#### Схемы введения

Согласно определенным вариантам настоящего изобретения многократные дозы антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против CD3 или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с CD20 и CD3) можно вводить индивидууму в течение определенного периода времени. Согласно этому аспекту изобретения способы включают последовательное введение индивидууму многократных доз антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Как используют в настоящем описании, "последовательное введение" означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят индивидууму в другой момент времени, например, на другие сутки с предопределенным интервалом (например, часы, сутки, недели или месяцы). Настоящее изобретение относится к способам, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующим введением одной или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы.

лекулы и необязательно с последующим введением одной или более третьих доз антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третьи дозы" относятся к последовательности введения во времени антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначаемую как "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы, и "третьи дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все начальные, вторичные и третьи могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако, в определенных вариантах осуществления количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальной, вторичных и/или третьих дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости увеличенное или уменьшенное) во время курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения как "ударные дозы" с дальнейшим введением последующих доз с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третью дозу вводят от 1 до 26 (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель непосредственно после предшествующей дозы. Как используют в настоящем описании, фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения каждой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы по этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третьих доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против CD3 или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с CD20 и CD3). Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третью дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третьих доз.

В вариантах осуществления, включающих многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, как и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту от 1 до 2 недель непосредственно после предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих многократные третьи дозы, каждую третью дозу можно вводить с такой же частотой, как и другие третьи дозы. Например, каждую третью дозу можно вводить пациенту от 2 до 4 недель непосредственно после предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой пациенту вводят вторичную и/или третью дозы может изменяться в течение курса лечения. Врач также может регулировать частоту введения во время курса лечения в зависимости от потребностей индивидуального пациента после клинического обследования.

#### **Виды диагностического использования антител**

Антитела против CD3 по настоящему изобретению также можно использовать для детекции и/или измерения экспрессирующих CD3 или CD3 клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело против CD3 или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, пониженной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) CD3. Иллюстративные диагностические анализы CD3 могут включать, например, приведение образца, получаемого у пациента, в контакт с антителом против CD3 по изобретению, где антитело против CD3 метят детектируемой меткой или репортерной молекулой. Альтернативно, немеченое антитело против CD3 можно использовать в диагностических применениях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе является меченым с возможностью детекции. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S или <sup>125</sup>I; флуоресцентную или хемилюминесцентную молекулу, такую как флуоресцеинизотиоцианат или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для детекции или измерения CD3 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и активируемую флуоресценцией сортировку клеток (FACS). Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах CD3 по настоящему изобретению, включают образец любой ткани или жидкости, получаемый у пациента, который содержит детектируемые количества белка CD3 или его фрагментов в нормальных или патологических состояниях. Как правило, уровни CD3 в конкретном образце, получаемом у здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью CD3), измеряют для того, чтобы изначально установить фоновый или стандартный уровень CD3. Затем этот фоновый уровень CD3 можно сравнивать с уровнями CD3, измеряемыми в образцах, получаемых у индивидуумов, у которых подозревают связанное с CD3 заболевание или состояние. ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры приводят для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и использовать способы и композиции по изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых числовых показателей (например, количеств, температуры и т.д.), но необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иначе, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температуру выражают в градусах Цельсия, и давление является атмосферным или близким к нему.

#### Пример 1. Получение антител против CD3

Антитела против CD3 получали иммунизацией мыши VELOCIMMUNE® (например, мыши, полученной способами генной инженерии, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) клетками, экспрессирующими CD3, или ДНК, кодирующей CD3. Гуморальный иммунный ответ наблюдали посредством иммунологического анализа специфического для CD3. Когда получали желаемый иммунный ответ, собирали спленоциты и сливали с миеломными клетками мыши для сохранения их жизнеспособности и получали линии гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток подвергали скринингу и отбирали для идентификации линии клеток, которые продуцировали специфические к CD3 антитела. Этим способом получали несколько химерных антител против CD3 (например, антитела, содержащие вариabельные домены человека и константные домены мыши). Кроме того, несколько полностью принадлежащих человеку антител против CD3 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в US 2007/0280945A1.

Определенные биологические свойства иллюстративных антител против CD3, получаемых в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, указанных ниже.

Пример 2. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариabельной области тяжелой и легкой цепей

В табл. 1 указаны идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей вариabельных областей и CDR выбранных антител против CD3 по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты указаны в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M2692N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M3542N	34	36	38	40	42	44	46	48
H1M3544N	50	52	54	56	58	60	62	64
H1M3549N	66	68	70	72	74	76	78	80
H1M3613N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M2689N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M2690N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M2691N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M2704N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M2705N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M2706N	178	180	182	184	186	188	190	192
H2M2707N	194	196	198	200	202	204	206	208
H2M2708N	210	212	214	216	218	220	222	224
H2M2709N	226	228	230	232	234	236	238	240
H2M2710N	242	244	246	248	250	252	254	256
H2M2711N	258	260	262	264	266	268	270	272
H2M2774N	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M2775N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M2776N	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M2777N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M2778N	338	340	342	344	346	348	350	352
H2M2779N	354	356	358	360	362	364	366	368
H2M2789N	370	372	374	376	378	380	382	384
H2M2862N	386	388	390	392	394	396	398	400
H2M2885N	402	404	406	408	410	412	414	416
H2M2886N	418	420	422	424	426	428	430	432
H2M3540N	434	436	438	440	442	444	446	448



046708

H2M3541N	450	452	454	456	458	460	462	464
H2M3543N	466	468	470	472	474	476	478	480
H2M3547N	482	484	486	488	490	492	494	496
H2M3548N	498	500	502	504	506	508	510	512
H2M3563N	514	516	518	520	522	524	526	528
H1H5751P	530	532	534	536	538	540	542	544
H1H5752P	546	548	550	552	554	556	558	560
H1H5753B	562	564	566	568	570	572	574	576
H1H5754B	578	580	582	584	586	588	590	592
H1H5755B	594	596	598	600	602	604	606	608
H1H5756B	610	612	614	616	618	620	622	624
H1H5757B	626	628	630	632	634	636	638	640
H1H5758B	642	644	646	648	650	652	654	656
H1H5761P	658	660	662	664	666	668	670	672
H1H5763P	674	676	678	680	682	684	686	688
H1H5764P	690	692	694	696	698	700	702	704
H1H5769P	706	708	710	712	714	716	718	720
H1H5771P	722	724	726	728	730	732	734	736
H1H5772P	738	740	742	744	746	748	750	752
H1H5777P	754	756	758	460	762	764	766	768
H1H5778P	770	772	774	776	778	780	782	784
H1H5780P	786	788	790	792	794	796	798	800
H1H5781P	802	804	806	808	810	812	814	816
H1H5782P	818	820	822	824	826	828	830	832
H1H5785B	834	836	838	840	842	844	846	848
H1H5786B	850	852	854	856	858	860	862	864
H1H5788P	866	868	870	872	874	876	878	880
H1H5790B	882	884	886	888	890	892	894	896
H1H5791B	898	900	902	904	906	908	910	912
H1H5792B	914	916	918	920	922	924	926	928
H1H5793B	930	932	934	936	938	940	942	944
H1H5795B	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5796B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5797B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5798B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008
H1H5799P	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5801B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040

H1H7194B	1042	1044	1046	1048	1234	1236	1238	1240
H1H7195B	1050	1052	1054	1056	1234	1236	1238	1240
H1H7196B	1058	1060	1062	1064	1234	1236	1238	1240
H1H7198B	1066	1068	1070	1072	1234	1236	1238	1240
H1H7203B	1074	1076	1078	1080	1234	1236	1238	1240
H1H7204B	1082	1084	1086	1088	1234	1236	1238	1240
H1H7208B	1090	1092	1094	1096	1234	1236	1238	1240
H1H7211B	1098	1100	1102	1104	1234	1236	1238	1240
H1H7221B	1106	1108	1110	1112	1234	1236	1238	1240
H1H7223B	1114	1116	1118	1120	1234	1236	1238	1240
H1H7226B	1122	1124	1126	1128	1234	1236	1238	1240
H1H7232B	1130	1132	1134	1136	1234	1236	1238	1240
H1H7233B	1138	1140	1142	1144	1234	1236	1238	1240
H1H7241B	1146	1148	1150	1152	1234	1236	1238	1240
H1H7242B	1154	1156	1158	1160	1234	1236	1238	1240
H1H7250B	1162	1164	1166	1168	1234	1236	1238	1240
H1H7251B	1170	1172	1174	1176	1234	1236	1238	1240
H1H7254B	1178	1180	1182	1184	1234	1236	1238	1240
H1H7258B	1186	1188	1190	1192	1234	1236	1238	1240
H1H7269B	1194	1196	1198	1200	1234	1236	1238	1240
H1H7279B	1202	1204	1206	1208	1234	1236	1238	1240
H1xH7221G	1210	1212	1214	1216	1234	1236	1238	1240
H1xH7221G3	1218	1220	1222	1224	1234	1236	1238	1240
H1xH7221G5	1226	1228	1230	1232	1234	1236	1238	1240

Таблица 2. Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M2692N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M3542N	33	35	37	39	41	43	45	47
H1M3544N	49	51	53	55	57	59	61	63
H1M3549N	65	67	69	71	73	75	77	79
H1M3613N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M2689N	97	99	101	103	105	107	109	111

## 046708

H2M2690N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M2691N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M2704N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M2705N	161	163	165	167	169	171	173	175
H2M2706N	177	179	181	183	185	187	189	191
H2M2707N	193	195	197	199	201	203	205	207
H2M2708N	209	211	213	215	217	219	221	223
H2M2709N	225	227	229	231	233	235	237	239
H2M2710N	241	243	245	247	249	251	253	255
H2M2711N	257	259	261	263	265	267	269	271
H2M2774N	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M2775N	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M2776N	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M2777N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M2778N	337	339	341	343	345	347	349	351
H2M2779N	353	355	357	359	361	363	365	367
H2M2789N	369	371	373	375	377	379	381	383
H2M2862N	385	387	389	391	393	395	397	399
H2M2885N	401	403	405	407	409	411	413	415
H2M2886N	417	419	421	423	425	427	429	431
H2M3540N	433	435	437	439	441	443	445	447
H2M3541N	449	451	453	455	457	459	461	463
H2M3543N	465	467	469	471	473	475	477	479
H2M3547N	481	483	485	487	489	491	493	495
H2M3548N	497	499	501	503	505	507	509	511
H2M3563N	513	515	517	519	521	523	525	527
H1H5751P	529	531	533	535	537	539	541	543
H1H5752P	545	547	549	551	553	555	557	559
H1H5753B	561	563	565	567	569	571	573	575
H1H5754B	577	579	581	583	585	587	589	591
H1H5755B	593	595	597	599	601	603	605	607
H1H5756B	609	611	613	615	617	619	621	623
H1H5757B	625	627	629	631	633	635	637	639
H1H5758B	641	643	645	647	649	651	653	655
H1H5761P	657	659	661	663	665	667	669	671
H1H5763P	673	675	677	679	681	683	685	687
H1H5764P	689	691	693	695	697	699	701	703

H1H5769P	705	707	709	711	713	715	717	719
H1H5771P	721	723	725	727	729	731	733	735
H1H5772P	737	739	741	743	745	747	749	751
H1H5777P	753	755	757	759	761	763	765	767
H1H5778P	769	771	773	775	777	779	781	783
H1H5780P	785	787	789	791	793	795	797	799
H1H5781P	801	803	805	807	809	811	813	815
H1H5782P	817	819	821	823	825	827	829	831
H1H5785B	833	835	837	839	841	843	845	847
H1H5786B	849	851	853	855	857	859	861	863
H1H5788P	865	867	869	871	873	875	877	879
H1H5790B	881	883	885	887	889	891	893	895
H1H5791B	897	899	901	903	905	907	909	911
H1H5792B	913	915	917	919	921	923	925	927
H1H5793B	929	931	933	935	937	939	941	943
H1H5795B	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5796B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5797B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5798B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007
H1H5799P	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023
H1H5801B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H7194B	1041	1043	1045	1047	1233	1235	1237	1239
H1H7195B	1049	1051	1053	1055	1233	1235	1237	1239
H1H7196B	1057	1059	1061	1063	1233	1235	1237	1239
H1H7198B	1065	1067	1069	1071	1233	1235	1237	1239
H1H7203B	1073	1075	1077	1079	1233	1235	1237	1239
H1H7204B	1081	1083	1085	1087	1233	1235	1237	1239
H1H7208B	1089	1091	1093	1095	1233	1235	1237	1239
H1H7211B	1097	1099	1101	1103	1233	1235	1237	1239
H1H7221B	1105	1107	1109	1111	1233	1235	1237	1239
H1H7223B	1113	1115	1117	1119	1233	1235	1237	1239
H1H7226B	1121	1123	1125	1127	1233	1235	1237	1239
H1H7232B	1129	1131	1133	1135	1233	1235	1237	1239
H1H7233B	1137	1139	1141	1143	1233	1235	1237	1239
H1H7241B	1145	1147	1149	1151	1233	1235	1237	1239
H1H7242B	1153	1155	1157	1159	1233	1235	1237	1239
H1H7250B	1161	1163	1165	1167	1233	1235	1237	1239
H1H7251B	1169	1171	1173	1175	1233	1235	1237	1239
H1H7254B	1177	1179	1181	1183	1233	1235	1237	1239
H1H7258B	1185	1187	1189	1191	1233	1235	1237	1239
H1H7269B	1193	1195	1197	1199	1233	1235	1237	1239
H1H7279B	1201	1203	1205	1207	1233	1235	1237	1239
H1xH7221G	1209	1211	1213	1215	1233	1235	1237	1239
H1xH7221G3	1217	1219	1221	1223	1233	1235	1237	1239
H1xH7221G5	1225	1227	1229	1231	1233	1235	1237	1239

Как правило, антитела в настоящем описании обозначают в соответствии со следующей ниже номенклатурой: префикс Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M" и т.д.) с последующим числовым идентификатором (например, "2712", "2692" и т.д., как продемонстрировано в табл. 1) с последующим индексом "P", "N" или "B". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой в настоящем описании антитело может быть обозначено как, например, "H1H2712N", "H1M2692N", "H2M2689N" и т.д. Префиксы H1H, H1M и H2M в обозначениях антител, используемых в настоящем описании, означают конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H1H" содержит Fc IgG1 человека, антитело "H1M" содержит Fc IgG1 мыши, и антитело "H2M" содержит Fc IgG2 мыши (все переменные области полностью принадлежат человеку, как обозначается посредством первой "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, содержащее конкретный изотип Fc, можно преобразовывать

в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно преобразовывать в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, представленными в табл. 1, остаются такими же, и ожидают, что свойства связывания являются идентичными или по существу аналогичными независимо от природы домена Fc.

Контрольные конструкции, используемые в следующих ниже примерах с целью сравнения в следующие ниже эксперименты включали различные контрольные конструкции (антитела против CD3) : "ОКТ-3", моноклональное антитело мыши против антигенов клеточной поверхности Т-клеток человека, доступное от American Type Culture Collection (ATCC) под каталожным номером CRL-8001, и "SP34", коммерчески доступное моноклональное антитело мыши, получаемое от Biologend, San Diego, CA (каталожный номер 302914), реакционноспособное против эpsilon-цепи комплекса T3 на клетках Т-лимфоцитов человека.

Пример 3. Аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека против CD3, получаемые с использованием поверхностного плазмонного резонанса

Аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека против CD3 определяли поверхностным плазмонным резонансом при 25°C с использованием формата захвата антитела (табл. 3, 5 и 7) или формата захвата антигена (табл. 4, 6 и 8). Измерения проводили на устройстве T200 Biacore.

В формате захвата антитела поверхность сенсора Biacore подвергают дериватизации антителами кролика против Fc мыши для захвата гибридомы (префикс антитела H1M или H2M) или антителами мыши против поверхности Fc человека для антитела в формате IgG человека (префикс антитела H1H). Растворимый гетеродимерный белок CD3 (hCD3-epsilon/hCD3-delta; SEQ ID NO:1370/1371) с меткой Fc человека (hFcΔAdp/hFc; SEQ ID NO:1372/1373) или меткой Fc мыши (mFcΔAdp/mFc; SEQ ID NO:1374/1375) впрыскивали в избытке на поверхность захвата антител и регистрировали ответ связывания. Гетеродимерный белок CD3 очищали способом, описанным у Davis et al. (US2010/0331527).

В формате связывания антигена проводили захват гетеродимерного белка CD3 с использованием антитела кролика против Fc мыши или антитела мыши против Fc человека и соответствующие антитела впрыскивали в избытке по сравнению с захватываемым антигеном.

Антитела анализировали в их общепринятом двухвалентном формате (табл. 3-6) или в одновалентной конфигурации с 1 плечом (табл. 7 и 8), в котором удаляли из антитела второй Fab, и экспрессировался только участок Fc (CH2-CH3).

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством обработки и аппроксимации данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0. Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) и полупериоды диссоциации ( $t_{1/2}$ ) связывания рассчитывали на основании кинетических констант скорости как:  $K_D (M) = k_d/k_a$  и  $t_{1/2} (мин) = \ln 2 / (60 * k_d)$ . NT=не тестировали; NB=не наблюдали связывания.

Таблица 3. Аффинности связывания Вiасоге гибридных mAb (H1M и H2M)

Связывание при 25°C/формат захвата антитела				
Антитело	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (молярная)	$T_{1/2}$ (мин)
H2M2689N	7,73E+05	3,23E-03	4,18E-09	4
H2M2690N	9,70E+03	2,02E-04	2,09E-08	57
H2M2691N	1,03E+04	2,07E-04	2,01E-08	56
H1M2692N	8,05E+03	4,34E-04	5,39E-08	27
H2M2704N	3,46E+04	6,92E-04	2,00E-08	17
H2M2705N	6,62E+04	9,10E-04	1,37E-08	13
H2M2706N	3,29E+04	4,44E-03	1,35E-07	3
H2M2707N	2,95E+04	1,87E-03	6,35E-08	6
H2M2708N	6,94E+04	6,12E-04	8,82E-09	19
H2M2709N	NT	NT	NT	NT
H2M2710N	6,72E+04	7,53E-04	1,12E-08	15
H2M2711N	6,72E+04	7,67E-04	1,14E-08	15
H1M2712N	9,32E+03	2,19E-04	2,35E-08	53
H2M2774N	7,79E+04	9,18E-04	1,18E-08	13
H2M2775N	6,97E+04	6,26E-04	8,98E-09	18
H2M2776N	6,29E+04	6,39E-04	1,02E-08	18
H2M2777N	3,70E+04	1,63E-03	4,39E-08	7
H2M2778N	2,13E+04	1,89E-04	8,90E-09	61
H2M2779N	2,18E+04	2,28E-04	1,05E-08	51
H2M2789N	NT	NT	NT	NT
H2M2862N	3,72E+04	3,00E-03	8,07E-08	4
H2M2885N	6,82E+04	6,51E-04	9,54E-09	18
H2M2886N	7,29E+04	6,53E-04	8,96E-09	18
H2M3540N	3,77E+04	6,11E-04	1,62E-08	19
H2M3541N	7,10E+03	1,35E-03	1,89E-07	9
H1M3542N	2,37E+04	5,08E-04	2,14E-08	23
H2M3543N	7,53E+03	2,26E-04	3,00E-08	51
H1M3544N	9,69E+03	1,42E-04	1,46E-08	82
H2M3547N	2,18E+04	3,47E-04	1,59E-08	33
H2M3548N	3,87E+04	5,04E-03	1,30E-07	2
H1M3549N	1,18E+04	9,19E-04	7,76E-08	13
H2M3563N	3,24E+04	1,19E-04	3,66E-09	97
H1M3613N	1,93E+04	3,04E-04	1,57E-08	38

Таблица 4. Аффинности связывания Віасоге гибридных mAb (H1M и H2M)

Связывание при 25°C/формат захвата антигена				
Антитело	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (с <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (молярная)	T <sub>1/2</sub> (мин)
H2M2689N	1,71E+06	9,97E-05	5,83E-11	116
H2M2690N	7,51E+04	6,35E-06	7,99E-11	1820
H2M2691N	3,94E+04	9,98E-06	2,54E-10	1158
H1M2692N	4,19E+04	9,90E-06	2,38E-10	1167
H2M2704N	1,32E+06	2,48E-04	1,87E-10	47
H2M2705N	2,43E+06	3,41E-04	1,40E-10	34
H2M2706N	5,63E+05	3,06E-04	5,44E-10	38
H2M2707N	3,99E+05	2,85E-04	7,15E-10	41
H2M2708N	1,73E+06	2,27E-04	1,31E-10	51
H2M2709N	NT	NT	NT	NT
H2M2710N	1,59E+06	2,43E-04	1,53E-10	48
H2M2711N	1,59E+06	2,40E-04	1,51E-10	48
H1M2712N	4,75E+04	1,37E-05	2,95E-10	846
H2M2774N	2,49E+06	3,36E-04	1,35E-10	34
H2M2775N	1,56E+06	2,16E-04	1,38E-10	53
H2M2776N	1,58E+06	2,22E-04	1,40E-10	52
H2M2777N	5,80E+05	3,21E-04	5,54E-10	36
H2M2778N	1,50E+05	6,57E-06	4,68E-11	1758
H2M2779N	1,28E+05	1,23E-05	9,38E-11	941
H2M2789N	NT	NT	NT	NT
H2M2862N	5,91E+05	3,21E-04	5,41E-10	36
H2M2885N	1,37E+06	1,52E-04	1,11E-10	76
H2M2886N	1,42E+06	1,36E-04	9,56E-11	85
H2M3540N	2,55E+06	5,87E-04	2,31E-10	20
H2M3541N	8,40E+04	1,16E-03	1,38E-08	10
H1M3542N	4,37E+05	2,00E-04	4,57E-10	58
H2M3543N	1,22E+05	7,96E-05	6,53E-10	145
H1M3544N	5,74E+04	5,98E-05	1,04E-09	193
H2M3547N	4,70E-05	1,00E-05	2,15E-11	1155
H2M3548N	NT	NT	NT	NT
H1M3549N	2,81E+05	2,89E-04	1,03E-09	40
H2M3563N	6,16E+05	4,77E-05	7,73E-11	242
H1M3613N	2,20E+05	9,60E-05	4,35E-10	120

Таблица 5. Аффинности связывания Віасоге mAb с Fc человека (H1H)

Связывание при 25°C/формат захвата антитела				
Антитело	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (с <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (молярная)	T <sub>1/2</sub> (мин)
H1H2690N	NT	NT	NT	NT
H1H2712N	3,06E+03	2,70E-04	8,82E-08	43
H1H5751P	4,01E+03	5,18E-04	1,29E-07	22
H1H5752P	NB	NB	NB	NB
H1H5753B	NT	NT	NT	NT
H1H5755B	8,21E+03	4,72E-04	5,75E-08	24
H1H5756B	8,15E+03	2,66E-04	3,26E-08	43
H1H5757B	6,63E+03	7,85E-04	1,18E-07	15
H1H5758B	5,02E+03	1,17E-03	2,33E-07	10
H1H5761P	4,72E+03	2,44E-02	5,16E-06	0
H1H5763P	1,85E+04	5,40E-02	2,92E-06	0

H1H5764P	4,16E+03	1,59E-02	3,82E-06	1
H1H5769P	7,80E+03	9,41E-04	1,21E-07	12
H1H5771P	3,00E+04	6,26E-04	2,09E-08	18
H1H5772S	1,56E+04	1,55E-03	9,96E-08	7
H1H5777P	1,35E+04	3,02E-03	2,24E-07	4
H1H5778P	5,52E+03	1,54E-04	2,78E-08	75
H1H5780P	1,31E+04	3,99E-04	3,04E-08	29
H1H5781P	8,61E+03	4,97E-04	5,77E-08	23
H1H5782P	NB	NB	NB	NB
H1H5785B	NT	NT	NT	NT
H1H5786B	1,26E+04	1,08E-03	8,54E-08	11
H1H5788P	2,88E+03	2,91E-04	1,01E-07	40
H1H5790B	1,82E+04	5,17E-04	2,83E-08	22
H1H5791B	1,09E+04	7,90E-04	7,25E-08	15
H1H5792B	NT	NT	NT	NT
H1H5793B	8,54E+03	3,82E-04	4,47E-08	30
H1H5795B	1,73E+04	5,76E-04	3,33E-08	20
H1H5796B	1,47E+04	8,91E-04	6,05E-08	13
H1H5797B	NT	NT	NT	NT
H1H5798B	NT	NT	NT	NT
H1H5799P	1,36E+04	7,88E-03	5,79E-07	1
H1H5801B	6,57E+03	1,62E-03	2,46E-07	7
ОКТЗ	2,10E+06	2,00E+00	1,00E-06	0,35 сек

Таблица 6. Аффинности связывания Висоге mAb с Fc человека (H1H)

Связывание при 25°C/формат захвата антигена				
Антитело	ka (Mс <sup>-1</sup> )	kd (с <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (молярная)	T½ (мин)
H1H2690N	NT	NT	NT	NT
H1H2712N	8,93E+04	8,68E-05	9,71E-10	133
H1H5751P	7,24E+04	2,47E-04	3,42E-09	47
H1H5752P	NB	NB	NB	NB
H1H5753B	NT	NT	NT	NT
H1H5755B	2,15E+05	2,01E-04	9,36E-10	57



H1H5756B	1,44E+05	1,11E-04	7,67E-10	105
H1H5757B	1,80E+05	2,95E-04	1,64E-09	39
H1H5758B	1,42E+05	5,62E-04	3,97E-09	21
H1H5761P	2,11E+05	1,13E-02	5,34E-08	1
H1H5763P	1,84E+05	1,70E-02	9,24E-08	1
H1H5764P	3,50E+05	7,36E-03	2,10E-08	2
H1H5769P	1,19E+05	5,23E-04	4,41E-09	22
H1H5771P	9,23E+05	3,42E-04	3,71E-10	34
H1H5772S	5,19E+05	8,69E-04	1,67E-09	13
H1H5777P	4,83E+05	1,70E-03	3,52E-09	7
H1H5778P	3,99E+05	3,42E-05	8,56E-11	338
H1H5780P	4,78E+05	1,71E-04	3,58E-10	68
H1H5781P	1,40E+05	2,68E-04	1,92E-09	43
H1H5782P	NB	NB	NB	NB
H1H5785B	NT	NT	NT	NT
H1H5786B	3,00E+06	4,24E-04	1,41E-10	27
H1H5788P	7,06E+04	1,64E-04	2,33E-09	70
H1H5790B	9,25E+05	2,36E-04	2,54E-10	49
H1H5791B	7,86E+05	3,40E-04	4,33E-10	34
H1H5792B	NT	NT	NT	NT
H1H5793B	4,78E+05	1,59E-04	3,33E-10	73
H1H5795B	1,58E+06	2,29E-04	1,45E-10	50
H1H5796B	1,05E+05	2,44E-04	2,32E-09	47
H1H5797B	NT	NT	NT	NT
H1H5798B	NT	NT	NT	NT
H1H5799P	7,18E+05	5,64E-03	7,85E-09	2
H1H5801B	3,31E+05	1,12E-03	3,38E-09	10
ОКТЗ	3,94E+06	2,18E-02	5,53E-09	0,5

Таблица 7. Аффинности связывания Віасоге одновалентных mAb с 1 плечом

Связывание при 25°C/формат захвата антитела				
Антитело	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (с <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (молярная)	T <sub>1/2</sub> (мин)
H1H7194P	1,16E+04	1,51E-04	1,30E-08	76

H1H7195P	3,13E+04	9,89E-05	3,16E-09	117
H1H7196P	1,07E+04	4,43E-04	4,13E-08	26
H1H7198P	2,63E+04	1,58E-04	6,02E-09	73
H1H7203P	1,46E+04	2,67E-04	1,83E-08	43
H1H7204P	1,43E+04	3,62E-04	2,53E-08	32
H1H7208P	NT	NT	NT	NT
H1H7211P	1,41E+04	1,59E-04	1,13E-08	73
H1H7221P	1,07E+04	2,92E-04	2,75E-08	40
H1H7223P	1,60E+04	3,07E-04	1,92E-08	38
H1H7226P	1,30E+04	3,55E-04	2,72E-08	33
H1H7232P	8,03E+03	1,77E-03	2,20E-07	7
H1H7233P	1,11E+04	2,69E-04	2,42E-08	43
H1H7241P	1,34E+04	2,95E-04	2,20E-08	39
H1H7242P	2,15E+04	6,64E-04	3,09E-08	17
H1H7250P	2,34E+04	2,47E-04	1,05E-08	47
H1H7251P	2,56E+04	1,07E-03	4,17E-08	11
H1H7254P	2,60E+04	3,88E-04	1,49E-08	30
H1H7258P	1,26E+04	3,02E-04	2,40E-08	38
H1H7269P	2,57E+04	6,24E-03	2,43E-07	2
H1H7279P	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G	NT	NT	NT	NT
H1xH7221G3	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G5	NB	NB	NB	NB

Таблица 8. Аффинности связывания Вiasoge одновалентных mAb с 1 плечом

Связывание при 25°C/формат захвата антигена				
Антитело	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (с <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (молярная)	T½ (мин)
H1H7194P	3,50E+05	8,43E-05	2,41E-10	137
H1H7195P	5,66E+05	7,14E-05	1,26E-10	162
H1H7196P	1,85E+05	4,61E-04	2,49E-09	25
H1H7198P	6,28E+05	7,07E-05	1,12E-10	163
H1H7203P	4,79E+05	2,38E-04	4,98E-10	48
H1H7204P	1,73E+05	3,65E-04	2,12E-09	32
H1H7208P	NT	NT	NT	NT
H1H7211P	3,45E+05	9,61E-05	2,79E-10	120
H1H7221P	1,36E+05	2,39E-04	1,75E-09	48
H1H7223P	1,87E+05	2,86E-04	1,53E-09	40
H1H7226P	4,18E+05	2,36E-04	5,65E-10	49
H1H7232P	1,49E+05	1,49E-03	1,00E-08	8
H1H7233P	1,61E+05	2,04E-04	1,27E-09	57
H1H7241P	1,87E+05	2,36E-04	1,26E-09	49
H1H7242P	3,83E+05	1,01E-03	2,63E-09	11
H1H7250P	2,31E+05	1,89E-04	8,20E-10	61
H1H7251P	4,47E+05	1,19E-03	2,67E-09	10
H1H7254P	4,33E+05	3,30E-04	7,62E-10	35
H1H7258P	1,33E+05	2,90E-04	2,18E-09	40
H1H7269P	2,77E+05	6,89E-03	2,49E-08	2
H1H7279P	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G	NT	NT	NT	NT
H1xH7221G3	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G5	NB	NB	NB	NB

Как представлено в табл. 3-8, некоторые антитела против CD3 по настоящему изобретению связываются с CD3 с высокой аффинностью в форматах захвата антитела или захвата антигена.

Пример 4. Антитела против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

Антитела против CD3 по настоящему изобретению тестировали на их способность связываться с Т-клетками человека и индуцировать их пролиферацию. Связывание оценивали с использованием клеток Jurkat (линии CD3+ Т-клеток человека), тогда как пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) оценивали с использованием количественного определения, катализируемого АТФ (CellTiter Glo®). Антитело против CD3 ОКТ3 действовало как положительный контроль и подходящие по нерелевантным изотипам антитела служили в качестве отрицательных контролей.

Данные FACS получали с использованием следующего ниже протокола: клетки при плотности  $2 \times 10^5$  на лунку инкубировали с серийно разведенными антителами в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали и добавляли вторичное антитело, и инкубировали еще дополнительно 30 мин. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 1% BSA и анализировали посредством проточной цитометрии с окном по живым клеткам Jurkat по боковому и прямому светорассеянию.  $EC_{50}$  для титрования связывания клеток определяли с использованием программного обеспечения Prism со значениями, вычисляемыми с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа.

Данные пролиферации получали с использованием следующего протокола: PBMC человека ( $5 \times 10^4$ /лунка) инкубировали с 3-кратным серийным разведением антитела против CD3 и фиксированной концентрации коммерческого антитела против CD28 (200 нг/мл) в 96-луночных планшетах в течение 72 часов при 37°C. После инкубации добавляли CellTiter Glo® и измеряли люминесценцию с использованием планшетного спектрофотометра с возможностью регистрации многих меток VICTOR X5 (PerkinElmer). Выживаемость клеток  $EC_{50}$  (катализируемое АТФ количественное определение) рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism.

Результаты экспериментов связывания и пролиферации обобщены в табл. 9-11.

Таблица 9. Гибридные mAb против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

Антитело	EC50 [M]	EC50 [M] hPBMC
	FACS JURKAT	Пролиферация
H2M2689N	NB	0,00E+00
H2M2690N	4,37E-09	5,37E-12
H2M2691N	6,77E-09	3,43E-11
H1M2692N	5,99E-09	1,42E-10
H2M2704N	8,45E-10	2,93E-12
H2M2705N	2,96E-10	1,76E-11

## 046708

H2M2706N	2,37E-09	3,86E-12
H2M2707N	1,24E-07	1,92E-12
H2M2708N	6,58E-10	2,69E-08
H2M2709N	7,11E-10	2,48E-11
H2M2710N	7,10E-10	2,11E-10
H2M2711N	1,16E-09	6,48E-10
H1M2712N	2,19E-08	1,28E-10
H2M2774N	3,52E-10	4,92E-10
H2M2775N	1,32E-09	1,09E-09
H2M2776N	4,91E-10	2,84E-11
H2M2777N	2,16E-09	2,51E-11
H2M2778N	3,62E-09	0,00E+00
H2M2779N	NT	0,00E+00
H2M2789N	NT	2,85E-08
H2M2862N	7,68E-09	6,72E-13
H2M2885N	2,09E-09	2,49E-12
H2M2886N	3,97E-09	2,69E-12
H2M3540N	3,99E-09	3,16E-12
H2M3541N	3,70E-09	6,40E-12
H1M3542N	2,01E-09	0,00E+00
H2M3543N	5,63E-09	6,12E-12
H1M3544N	2,32E-08	0,00E+00
H2M3547N	2,71E-09	5,02E-12
H2M3548N	1,10E-09	1,89E-12
H1M3549N	2,30E-09	0,00E+00
H2M3563N	1,07E-09	7,74E-12
H1M3613N	1,03E-08	0,00E+00
Изотип Ctrl	NB	0,00E+00

NB: нет связывания; NT: не тестировали

Таблица 10. mAb с Fc человека против CD3 связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

Антитело	EC50 [M]	EC50 [M] hPBMC
	FACS JURKAT	Пролиферация
H1H5751P	2,12E-09	9,29E-12
H1H5752P	3,43E-10	1,09E-12
H1H5753B	NB	9,14E-11
H1H5755B	1,23E-09	4,24E-12
H1H5756B	NB	0,00E+00
H1H5757B	3,38E-09	4,86E-12
H1H5758B	1,90E-09	2,13E-12
H1H5761P	2,10E-09	3,62E-13
H1H5763P	2,76E-09	3,11E-13
H1H5764P	8,80E-10	3,27E-13
H1H5769P	4,10E-09	6,17E-12
H1H5771P	NT	6,35E-12
H1H5772S	6,64E-10	4,42E-12
H1H5777P	5,71E-10	3,04E-12
H1H5778P	6,85E-10	5,04E-12
H1H5780P	7,62E-10	3,44E-12
H1H5781P	1,23E-09	6,08E-12
H1H5782P	NB	5,17E-12
H1H5785B	NB	0,00E+00
H1H5786B	1,10E-09	1,79E-12
H1H5788P	3,53E-09	4,62E-12
H1H5790B	3,55E-09	2,71E-12
H1H5791B	3,77E-09	1,75E-12
H1H5792B	5,87E-09	6,47E-12
H1H5793B	4,62E-09	3,28E-12
H1H5795B	2,04E-09	3,09E-12
H1H5796B	9,82E-09	4,37E-12
H1H5797B	3,96E-08	1,07E-11
H1H5798B	5,57E-09	2,59E-12
H1H5799P	NT	1,63E-13
H1H5801B	1,55E-08	1,09E-12
ОКТ3	1,96E-10	3,30E-13
Изотип Ctrl	NB	0,00E+00

NB: нет связывания; NT: не тестировали

Таблица 11. Одновалентные mAb против CD3 с 1 плечом связываются с Т-клетками человека и вызывают их пролиферацию

Антитело	EC50 [M]	EC50 [M] hPBMC
	FACS JURKAT	Пролиферация
H1H7194P	1,50E-09	2,37E-12
H1H7195P	3,42E-10	2,42E-12
H1H7196P	3,44E-08	1,27E-12
H1H7198P	7,26E-10	2,55E-12
H1H7203P	3,24E-09	1,64E-12
H1H7204P	2,29E-09	1,51E-12
H1H7208P	5,19E-08	1,46E-12
H1H7211P	7,01E-10	2,75E-12
H1H7221P	1,40E-09	2,60E-12
H1H7223P	9,37E-10	1,07E-12
H1H7226P	7,95E-10	9,52E-13
H1H7232P	1,50E-09	1,03E-12
H1H7233P	7,15E-10	7,34E-13
H1H7241P	1,01E-09	1,05E-12
H1H7242P	1,83E-09	2,13E-12
H1H7250P	1,37E-09	2,43E-12
H1H7251P	1,45E-09	1,30E-12
H1H7254P	1,09E-09	2,80E-12
H1H7258P	1,07E-09	2,17E-12
H1H7269P	1,95E-09	1,15E-12
H1H7279P	NB	0,00E+00
Изотип Ctrl	NB	0,00E+00

NB: нет связывания; NT: не тестировали

Как представлено в табл. 7-9, большая часть антител против CD3 по изобретению связывалась с Т-клетками человека и индуцировала пролиферацию Т-клеток.

Пример 5. Антитела против CD3 связываются с Т-клетками обезьяны и вызывают их пролиферацию

Субпопуляцию антител против CD3 по изобретению тестировали на способность связываться с Т-клетками обезьяны и индуцировать их пролиферацию.

Данные FACS получали с использованием следующего протокола: Клетки при плотности  $2 \times 10^5$  на лунку инкубировали с серийно разведенными антителами в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали и добавляли вторичные антитела и инкубировали еще дополнительно 30 мин. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 1% BSA, и анализировали посредством проточной цитометрии. Окно выстраивали по CD4+ Т-клеткам обезьяны по боковому и прямому светорассеянию и на популяции CD2+CD4+CD20. EC<sub>50</sub> для титрования связывания клеток рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism.

Данные пролиферации получали с использованием следующего протокола: Только что выделенные PBMC, получаемые из яванского макака ( $5 \times 10^4$ /лунку) инкубировали с 3-кратным серийным разведением антитела против CD3 и фиксированной концентрацией коммерческого антитела против CD28 (500 нг/мл) в 96-луночных планшетах в течение 72 ч при 37°C. После инкубации добавляли CellTiter Glo® и измеряли люминесценцию с использованием планшетного спектрофотометра с возможностью регистрации многих меток VICTOR X5 (PerkinElmer). EC<sub>50</sub> жизнеспособности клеток (катализируемое АТФ количественное определение) рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism.

Результаты экспериментов связывания и пролиферации обобщены в табл. 12 и 13.

Таблица 12. mAb против CD3 связываются с РВМС обезьяны и вызывают их пролиферацию

Антитело	EC50 [M]	EC50 [M] mFРВМС
	FACS РВМС	Пролиферация
H1H2690N	5,66E-09	2,71E-12
H1H2712N	2,29E-09	2,72E-12
H2M3547N	1,12E-10	NT
H2M3563N	1,65E-10	NT
H1H5761P	NT	2,81E-09
H1H5763P	NT	0,00E+00
H1H5764P	NT	4,06E-10
H1H5769P	NT	8,33E-13
H1H5771P	NT	2,74E-12
H1H5772S	NT	1,47E-12
H1H5778P	NT	5,93E-13
H1H5780P	NT	3,13E-13
H1H5781P	NT	7,92E-13
H1H5788P	NT	2,01E-12
ОКТ3	NB	NT
SP34	7,03E-11	1,71E-12

NB: нет связывания; NT: не тестировали

Таблица 13. Одновалентные mAb против CD3 с 1 плечом связываются с РВМС обезьяны и вызывают их пролиферацию

Антитело	EC50 [M]	EC50 [M] mFРВМС
	FACS РВМС	Пролиферация
H1H7194P	NT	4,84E-12
H1H7195P	NT	1,36E-12
H1H7196P	NT	1,40E-08
H1H7198P	NT	2,29E-12
H1H7203P	NT	4,97E-13
H1H7204P	NT	1,26E-11
H1H7208P	NT	7,02E-12
H1H7211P	NT	2,81E-13
H1H7221P	NT	1,72E-12
H1H7223P	NT	6,75E-11
H1H7226P	NT	2,26E-11
H1H7232P	NT	4,90E-11
H1H7233P	NT	4,35E-12
H1H7241P	NT	2,05E-11
H1H7242P	NT	1,38E-11
H1H7250P	NT	7,27E-11
H1H7251P	NT	1,83E-11
H1H7254P	NT	8,88E-11
H1H7258P	NT	1,11E-11

NB: нет связывания; NT: не тестировали

Как представлено в табл. 12 и 13, некоторые антитела против CD3 по изобретению связывались с CD2+CD4+ Т-клетками обезьяны и индуцировали их пролиферацию. ОКТ3 не вызывало пролиферацию РВМС обезьяны, тогда как SP34 являлись активными против РВМС обезьяны.

Пример 6. mAb против CD3 поддерживают опосредованный Т-клетками цитотоксический цитолиз опухолевых клеток

Исследовали способность антител против CD3 направлять опосредованный Т-клетками цитотоксический цитолиз через взаимодействие Fc/FcR с использованием анализа цитотоксичности U937 на основе кальцеина. В кратком изложении, выделяли РВМС человека в избытке фиколл-пака и активировали в течение нескольких суток средой, содержащей IL-2 человека (30 Ед/мл) и гранулами для активации Т-клеток (антигена против CD3/CD28). Клетки U937 метили кальцеином, а затем инкубировали с активированными Т-клетками при отношении эффектор:мишень 10:1 с использованием 3-кратного серийного разведения антител в течение 3 ч при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали и переносили супернатанты в прозрачный черный планшет с чистым дном для флуоресцентного анализа. Значения EC<sub>50</sub>, которые определяли как малярная концентрация антитела против CD3, которая индуцирует 50% цитотоксичность, рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism. Результаты с использованием гибридных антител, антител с Fc человека и одновалентных антител с одним плечом представлены в табл. 14, 15 и 16 соответственно.

Таблица 14. Гибридные mAb против CD3 перенаправляют Т-клеточный цитолиз на клетки U937

Антитело	Цитотоксичность U937 Т-клетки человека [M]
H2M2689N	0,00E+00
H2M2690N	2,79E-11
H2M2691N	2,34E-11
H1M2692N	3,59E-10
H2M2704N	2,49E-12
H2M2705N	1,73E-12
H2M2706N	7,91E-12
H2M2707N	7,21E-12
H2M2708N	3,27E-12
H2M2709N	3,47E-12
H2M2710N	3,97E-12
H2M2711N	3,66E-12
H1M2712N	3,14E-10
H2M2774N	2,46E-12
H2M2775N	3,38E-12
H2M2776N	4,06E-12
H2M2777N	4,86E-12
H2M2778N	0,00E+00
H2M2779N	6,75E-10
H2M2789N	NT
H2M2862N	7,66E-12
H2M2885N	3,71E-12
H2M2886N	8,06E-12
H2M3540N	1,25E-11
H2M3541N	5,39E-11
H1M3542N	2,92E-11
H2M3543N	1,31E-11
H1M3544N	1,72E-10
H2M3547N	3,17E-11
H2M3548N	5,50E-12
H1M3549N	1,07E-10
H2M3563N	4,05E-11
H1M3613N	8,66E-10
Изотип Ctrl	0,00E+00

NT: не тестировали



Таблица 15. mAb против CD3 с форматированным Fc человека перенаправляют Т-клеточный цитолиз на клетки U937

Антитело	Цитотоксичность U937 Т-клетки человека [M]
H1H5751P	1,30E-10
H1H5752P	1,85E-11
H1H5753B	3,79E-10
H1H5755B	5,16E-11
H1H5756B	7,69E-11
H1H5757B	9,65E-11
H1H5758B	8,86E-08
H1H5761P	2,00E-12
H1H5763P	NT
H1H5764P	NT
H1H5769P	5,65E-11
H1H5771P	NT
H1H5772S	6,89E-13
H1H5777P	4,87E-13
H1H5778P	3,41E-13
H1H5780P	4,03E-12
H1H5781P	1,83E-12
H1H5782P	5,18E-12
H1H5785B	4,43E-11
H1H5786B	6,10E-11
H1H5788P	1,54E-11
H1H5790B	8,71E-11
H1H5791B	8,01E-11
H1H5792B	1,40E-10
H1H5793B	8,85E-11
H1H5795B	6,74E-11
H1H5796B	5,03E-10
H1H5797B	5,76E-10
H1H5798B	1,81E-10
H1H5799P	NT
H1H5801B	9,23E-11
ОКТ3	2,35E-12
Изотип Ctrl	0,00E+00

NT: не тестировали

Таблица 16. Одновалентные mAb против CD3 с 1 плечом перенаправляют Т-клеточный цитолиз на клетки U937

Антитело	Цитотоксичность U937 Т-клетки человека [M]
H1H7194P	4,71E-12
H1H7195P	6,10E-12
H1H7196P	1,96E-11
H1H7198P	5,21E-12
H1H7203P	5,47E-12
H1H7204P	1,08E-11
H1H7208P	4,59E-11
H1H7211P	7,89E-12
H1H7221P	9,21E-12
H1H7223P	5,30E-12
H1H7226P	1,04E-11
H1H7232P	9,96E-12
H1H7233P	1,19E-11
H1H7241P	1,23E-11
H1H7242P	7,50E-12
H1H7250P	5,91E-12
H1H7251P	1,81E-12
H1H7254P	4,18E-12
H1H7258P	1,53E-11
H1H7269P	1,08E-11
H1H7279P	0,00E+00
Изотип Ctrl	0,00E+00

NT: не тестировали

Как указано в табл. 14-16 большинство антител против CD3, а также ОКТ3, поддерживали перенаправленный опосредованный Т-клетками цитолиз в этой системе анализа. Наблюдаемый цитолиз, который как полагают, зависит от взаимодействия Fc антитела с рецептором Fc на клетках U937, приводящего к образованию кластеров CD3 на прилежащих Т-клетках, подавляли добавлением неспецифического IgG человека (данные не показаны).

Пример 7. Получение биспецифических антител, которые связываются с CD3 и CD20

Биспецифические антитела, содержащие специфический связывающий домен антитела против CD3 и специфический связывающий домен антитела против CD20 конструировали с использованием стандартной методологии, где тяжелую цепь и легкую цепь из антитела против CD3 комбинировали с тяжелой цепью из антитела против CD20. Антитела против CD3, используемые для конструкции биспецифических антител этого примера, получали иммунизацией мыши Veloclmmune® клетками, экспрессирующими CD3, или ДНК, кодирующей CD3, или в случае BS3/20-007 и -009, из известного антитела против CD3 (например, антитела против CD3 "L2K", как указано в WO 2004/106380). Антитела против CD20, используемые для конструкции биспецифических антител этого примера, указаны в US 7879984.

Биспецифические антитела, получаемые в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (например, связывающие плечи). Первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, получаемую из антитела против CD20 ("CD20-VH"), спаренную с переменной областью легкой цепи, получаемой из антитела против CD3 ("CD3-VL"). Спаривание CD20-VH/CD3-VL создает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD20. Второй антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, получаемую из антитела против CD3, ("CD3-VH"), спаренную с переменной областью легкой цепи, получаемой из антитела против CD3 ("CD3-VL"). Спаривание CD3-VH/CD3-VL создает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает CD3. Одинаковую CD20-VH использовали во всех биспецифических антителах, получаемых в этом примере, и обозначали как "CD20-VH-A" (за исключением BS3/20-009, для которого использовали другую CD20-VH, которую обозначали как "CD20-VH-B"). Однако несколько других компонентов CD3-VH и CD3-VL (обозначаемых "CD3-VH-A, CD3-VH-B и т.д., и CD3-VL-A, CD3-VL-B и т.д., получаемых из других антител против CD3) использовали в других биспе-

цифических антителах следующих ниже примеров.

Краткое описание частей компонентов антигенсвязывающих доменов различных биспецифических антител, получаемых в соответствии в этом примером, указано в табл. 17.

Таблица 17

Идентификатор биспецифического антитела	Антигенсвязывающий домен антитела против CD20		Антигенсвязывающий домен антитела против CD3	
	Варибельная область тяжелой цепи	Варибельная область легкой цепи	Варибельная область тяжелой цепи	Варибельная область легкой цепи
BS3/20-001	CD20-VH-A	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CD3-VL-A
BS3/20-002	CD20-VH-A	CD3-VL-B	CD3-VH-B	CD3-VL-B
BS3/20-003	CD20-VH-A	CD3-VL-C	CD3-VH-C	CD3-VL-C
BS3/20-004	CD20-VH-A	CD3-VL-D	CD3-VH-D	CD3-VL-D
BS3/20-005	CD20-VH-A	CD3-VL-E	CD3-VH-E	CD3-VL-E
BS3/20-007	CD20-VH-A	CD3-VL-F <sup>#</sup>	CD3-VH-F <sup>#</sup>	CD3-VL-F <sup>#</sup>
BS3/20-009*	CD20-VH-B	CD3-VL-F <sup>#</sup>	CD3-VH-F <sup>#</sup>	CD3-VL-F <sup>#</sup>

<sup>#</sup> Варибельные области тяжелой и легкой цепей CD3-VH-F и CD3-VL-F получали из антител против CD3, обозначаемых "L2K", как указано в WO 2004/106380.

\* Плечо против CD20 BS3/20-009, содержащее спаренную CD20-VH-B/CD3-VL-F, является не функциональным; например, оно не связывается с CD20. Однако плечо против CD3 (содержащее спаренную CD3-VH-F/CD3-VL-F) специфически связывается с CD3. Таким образом, BS3/20-009 сохраняет такую же общую "биспецифическую" структуру других биспецифических молекул, получаемых в этом примере, но оно связывается только с CD3.

В табл. 18 и 19 указаны идентификаторы аминокислотных последовательностей для различных варибельных областей тяжелой цепи (табл. 18) и варибельных областей легкой цепи (табл. 19) и их соответствующие CDR биспецифических антител из этого примера.

Таблица 18. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD20-VH-A	1242	1244	1246	1248
CD20-VH-B	1338	1340	1342	1344
CD3-VH-A	1250	1252	1254	1256
CD3-VH-B	1266	1268	1270	1272
CD3-VH-C	1282	1284	1286	1288
CD3-VH-D	1298	1300	1302	1304
CD3-VH-E	1314	1316	1318	1320
CD3-VH-F	1329	1330	1331	1332

Таблица 19. Аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	1258	1260	1262	1264
CD3-VL-B	1274	1276	1278	1280
CD3-VL-C	1290	1292	1294	1296
CD3-VL-D	1306	1308	1310	1312
CD3-VL-E	1322	1324	1326	1328
CD3-VL-F	1333	1334	1335	1336

Кроме того, в табл. 20 и 21 указаны идентификаторы последовательности для нуклеотидных последовательностей, кодирующих варибельные области тяжелой цепи (табл. 20) и варибельные области легкой цепи (табл. 21) и их соответствующие CDR, биспецифических антител из этого примера.

Таблица 20. Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности  
вариабельной области тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD20-VH-A	1241	1243	1245	1247
CD20-VH-B	1337	1339	1341	1343
CD3-VH-A	1249	1251	1253	1255
CD3-VH-B	1265	1267	1269	1271
CD3-VH-C	1281	1283	1285	1287
CD3-VH-D	1297	1299	1301	1303
CD3-VH-E	1313	1315	1317	1319

Таблица 21. Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности  
вариабельной области легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	1257	1259	1261	1263
CD3-VL-B	1273	1275	1277	1279
CD3-VL-C	1289	1291	1293	1295
CD3-VL-D	1305	1307	1309	1311
CD3-VL-E	1321	1323	1325	1327

В дополнение к биспецифическим антителам, описанным выше, следующие ниже контрольные антитела также использовали в определенных экспериментах, указанных в примерах, которые являются такими, как указано ниже:

Контроль I: моноклональное антитело "ОКТ-3" против антигенов клеточной поверхности Т-клеток человека, как указано в US 4361549, и доступное из гибридомы CRL-8001 (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Контроль II: Антитело "SP34" реакционноспособное против эpsilon-цепи комплекса T3 на клетках Т-лимфоцитов человека, доступное от BD Pharmagen, каталожный № 55052.

Контроль III: Терапевтическое антитело против CD20 с последовательностями тяжелой и легкой цепей ритуксана (ритуксимаб), как описано в US 5736137.

Контроль IV: Моноклональное антитело против CD20, обозначаемое "3B9-10", как описано в US 7879984, и указанное в настоящем описании как антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO:1242/1346 и аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 1244-1246-1248-1348-1350-1352.

Контроль V: Моноклональное антитело против CD20, обозначаемое "10F2-13", как описано в US 7879984, и указанное в настоящем описании как антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO:1354/1362 и аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO:1356-1358-1360-1364-1366-1368.

Пример 8 Биспецифические антитела CP20×CD3 избирательно связываются с клетками Jurkat, Raji и Т-клетками обезьяны

Биспецифические антитела CD20×CD3 и контрольные конструкции, указанные в примере 1, тестировали посредством FACS на их способность связываться с Jurkat (CD3+, CD20 линией Т-клеток человека), Raji (CD3-, CD20+ линией В-клеток человека) или РВМС яванского макака ("клетки mkT").

Данные FACS получали с использованием следующего протокола: Клетки при плотности  $2 \times 10^5$  на лунку инкубировали с серийно разведенными антителами в течение 30 мин на льду. После инкубации клетки промывали и добавляли подходящие вторичные (клетки Jurkat, RAJI) антитела или смесь вторичных антител (для РВМС яванского макака) и инкубировали дополнительно в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 1% BSA, и анализировали посредством проточной цитометрии на BD FACS Canto II. Клетки Jurkat и Raji выравнивали в окне по прямому и боковому светорассеянию, при этом Т-клетки яванского макака также выравнивали в окне по CD2+CD4+ популяции.  $EC_{50}$  для ингибирующего титрования клеток определяли с использованием программного обеспечения Prism со значениями, рассчитываемыми с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа. Результаты приведены в табл. 22.

Таблица 22. Значения EC<sub>50</sub> связывания (моль) для биспецифических антител CD3×CD20

Антитело	FACS – Jurkat	FACS – RAJI	FACS – клетки мкТ
Контроль I (антитело против CD3)	1,96E-10	NB	NB
Контроль II (антитело против CD3)	(+)	NB	7,03E-11
Контроль IV (антитело против CD20)	Без связывания	(+)	NB
BS3/20-001	3,85E-08	5,99E-08	8,74E-06
BS3/20-002	5,62E-08	1,15E-08	NT
BS3/20-003	5,67E-08	9,24E-08	2,48E-08
BS3/20-004	4,89E-08	1,02E-08	NT
BS3/20-005	1,95E-09	8,17E-08	NT

(+) Значения EC<sub>50</sub> не определяли, но связывание наблюдали;  
NB связывание отсутствует;  
NT не тестировали

Как указано в табл. 22, панели для тестируемых антител демонстрировали диапазон аффинностей связывания на различных линиях клеток, в зависимости от их специфичности. Биспецифических антитела (BS3/20-001, -002, -003, -004 и -005) обладали способностью связываться с обоими линиями-мишенями человека. Подпопуляция антител также обладала способностью связываться с клетки яванского макака (контроль II, BS3/20-001 и BS3/20-003). Контроль I против CD3 (ОКТ3), контроль II против CD3 (SP34) и контроль IV против CD20 связывались с клетками Jurkat, Т-клетки яванского макака и RAJI, соответственно.

Пример 9. Биспецифические антитела CP20×CD3 индуцируют пролиферацию PBMC in vitro

Способность отобранных биспецифических антител CD20×CD3 и контрольных конструкций стимулировать мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и индуцировать пролиферацию оценивали с использованием катализируемой АТФ количественной оценки (CellTiter Glo®). Активация PBMC приводит к выделению цитокинов, которые направляют пролиферацию клеток.

Данные по пролиферации получали с использованием следующего протокола: активированные PBMC человека или яванского макака ( $5 \times 10^5$ /луночка) инкубировали с 3-кратным серийным разведением антитела против CD3×CD20 или контрольным антителом в 96-луночных планшетах в течение 72 ч при 37°C. После инкубации добавляли CellTiter Glo® и измеряли люминесценцию с использованием планшетного спектрофотометра с возможностью регистрации многих меток VICTOR X5 (PerkinElmer). EC<sub>50</sub> жизнеспособности клеток (катализируемое АТФ количественное определение) определяли с использованием программного обеспечения Prism. Значения рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа, и они представлены в табл. 23.

Таблица 23. EC<sub>50</sub> для пролиферации PBMC человека и яванского макака, индуцируемой биспецифическими антителами против CD20×CD3

Антитело	EC <sub>50</sub> пролиферации PBMC человека [M]	EC <sub>50</sub> пролиферация PBMC яванского макака [M]
Контроль I	3,30E-13	NA
Контроль II	8,93E-12	1,71E-12
BS3/20-001	1,08E-11*	4,02E-11*
BS3/20-002	8,59E-12*	2,60E-11*
BS3/20-003	9,55E-12*	2,78E-11*
BS3/20-004	1,45E-12*	NT
BS3/20-005	1,05E-12*	NT

(\*) Данные представляют собой медианные значения 3 или более независимых анализов. Данные без (\*) представляют собой характерные/средние значения 1 или 2 независимых анализов. NA=отсутствие активности; NT=не тестировали.

Как продемонстрировано в табл. 23, все биспецифические антитела против CD20×CD3 по изобретению являлись активаторами PBMC человека или яванского макака. Как правило, моноспецифические бивалентные исходные антитела против CD3 (контроли I и II) являлись в 2-10 раз более эффективными по сравнению с биспецифическими аналогами. Контроль I (ОКТ3) активировал пролиферацию PBMC обезьян, тогда как контроль II (SP34) являлся активным против PBMC человека и обезьяны.

Пример 10. Биспецифические антитела CP20×CD3 активируют Т-клетки и индуцируют выделение IFN-гамма и повышение экспрессии CD25 в цельной крови человека

Отобранные биспецифические антитела против CD20×CD3 тестировали на их способность активировать Т-клетки в цельной крови человека. Степень активации Т-клеток определяли путем измерения секреции интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ), а также повышения экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках.

Секрецию интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ) количественно определяли путем объединения гепаринизированной цельной крови с 5-кратными серийными разведениями биспецифических антител в 96-луночных планшетах. Через 20 ч планшеты центрифугировали в течение 5 мин и удаляли плазму для анализа ELISA для определения уровней IFN $\gamma$ . Экстраполированные концентрации IFN $\gamma$  наносили на график в зависимости от концентрации антитела и рассчитывали значения EC<sub>50</sub> с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism.

Для анализа экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках после инкубации с антителами и удаления плазмы, 150 мкл крови переносили в планшет с высокими стенками и подвергали лизису в течение 15 мин с 1,5 мл буфера RBC для лизиса. Клетки дважды промывали, блокировали в течение 10 мин при комнатной температуре с блокирующим реагентом hFcR, а затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C с антителами, конъюгированными непосредственно с CD2, CD19, CD4, CD8 и CD25. Затем клетки дважды промывали перед анализом с использованием цитометра FACSCanto и программного обеспечения FlowJo.

Процент CD2+CD8+ Т-клеток, экспрессирующих маркер активации CD25, наносили на график в зависимости от концентрации антитела и рассчитывали значения EC<sub>50</sub> с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism. Результаты представлены в табл. 24.

Таблица 24. Значения EC<sub>50</sub> опосредованного биспецифическим антителом повышения экспрессии CD25 и продукции IFN $\gamma$  в цельной крови

Биспецифическое антитело	EC <sub>50</sub> повышения экспрессии CD25 [М]	EC <sub>50</sub> продукции IFN $\gamma$ [М]	Максимум IFN $\gamma$ (пг/мл)
BS3/20-001	1,3E-10	3,9E-10	1815
BS3/20-003	1,7E-10	5,7E-10	1693
BS3/20-004	2,9E-10	2,3E-09	5810

Медианные значения по меньшей мере 3 независимых экспериментов (за исключением экспрессии IFN-гамма BS3/20-003, в котором n=2)

Как представлено в табл. 24 биспецифические антитела против CD20×CD3 опосредуют повышение экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках в цельной крови со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне 130-290 пМ с соответствующими значениями EC<sub>50</sub> для IFN $\gamma$ , которые находились в незначительно более высоком диапазоне от 390 пМ до 2 нМ. BS3/20-004 являлось незначительно менее эффективным по сравнению с BS3/20-001 и BS3/20-003 относительно опосредования повышения экспрессии CD25 и продукции IFN $\gamma$ , как определяют по EC<sub>50</sub>, однако BS3/20-004 может индуцировать более высокие уровни IFN $\gamma$  в культурах цельной крови.

Пример 11. Биспецифические антитела CP20×CD3 индуцируют опосредованную Т-клетками цитотоксичность в линиях клеток, устойчивых к ритуксимабу

Способность отобранных биспецифических антител против CD20×CD3 и контрольных конструкций опосредовать обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC) и опосредованную Т-клетками цитотоксичность оценивали с использованием исходных клеток Raji и линий SCID Raji. Последние (линии SCID Raji) получали из отдельных опухолей, устойчивых к антителам против CD20, выделяемым у иммунодефицитных мышей, которым подкожно инъецировали клетки Raji после обработки mAb против CD20 ритуксимабом. В этом примере использовали четыре линии (SCID Raji 1-4).

Экспрессию CD20 и ингибирующих комплемент молекул CD55 и CD59 в линиях клеток Raji определяли посредством FACS. В кратком изложении, клетки 1×10<sup>6</sup> инкубировали в отдельных пробирках в течение 30 мин с антителами, непосредственно конъюгированными с CD20, CD55 и CD59. Клетки дважды промывали перед получением данных FACS с использованием цитометра FACSCanto и анализа с использованием программного обеспечения FlowJo.

Для определения способности антител против CD20 и против CD3×CD20 опосредовать направленными Т-клетками цитолиз линий клеток Raji меченые кальцеином клетки Raji инкубировали в течение 2 ч при 37°C с предварительно активированными Т-клетками (выделяемые с использованием фиколла PBMC человека, активированные rhIL-2 (30 Ед/мл) и активирующими гранулами с антителами против CD3/CD28) и 3-кратными серийными разведениями антител, начиная от 2 нМ. После инкубации планшеты центрифугировали и переносили супернатанты в прозрачный черный планшет с чистым дном для детекции флуоресценции при 530 нм при испускании 485 нм. Процент цитотоксичности определяли на основании значений спонтанного (только клетки-мишени) и максимального выделения (клетки-мишени,

лизированные с детергентом). Значения  $EC_{50}$  рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism.

Для определения активности антител опосредовать CDC линии клеток Raji инкубировали с 5% нормальным сывороточным комплементом человека и 3-кратными серийными разведениями антител, начиная от 100 нМ. После инкубации в течение 4,5 часов при 37°C определяли гибель клеток с использованием CellTiter Glo®. Процент цитотоксичности определяли на основании значений спонтанного (только клетки-мишени alone) и максимального выделения (клетки-мишени, лизированные с детергентом). Значения  $EC_{50}$  рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism.

Результаты представлены в табл. 25.

Таблица 25. Значения  $EC_{50}$  для опосредованной антителом CDC и опосредованной Т-клетками цитотоксичности

Линия клеток	MFI CD20	% CD55/CD59+	CDC			Опосредованная Т-клетками цитотоксичность	
			BS3/20-007	контроль IV (антитела против CD20)	контроль III (антитела против CD20)	BS3/20-007	контроль IV (антитела против CD20)
Raji	1709	8,81	2,62E-09	2,47E-10	9,66E-11	1,66E-12	Отсутствие активности
Raji SCID1	570	80,7	1,01E-07	5,19E-08	8,56E-08	1,11E-12	Отсутствие активности
Raji SCID2	1373	9,1	8,83E-09	2,29E-10	5,87E-11	6,52E-13	Отсутствие активности
Raji SCID3	1151	97,3	3,77E-08	5,71E-09	2,55E-08	2,93E-13	Отсутствие активности
Raji SCID4	1717	64,6	1,40E-07	1,14E-09	5,29E-09	1,53E-12	Отсутствие активности

По сравнению с исходными клетками Raji для 2 из 4 линий SCID Raji демонстрировали пониженную экспрессию CD20 (табл. 25; линии SCID Raji 1 и 3) со значительно более высоким процентом клеток, экспрессирующих ингибирующие комплемент молекулы CD55 и CD59. Чувствительность клеток SCID Raji к CDC, опосредованной антителами против CD20 или против CD20×CD3 зависела от процента экспрессирующих CD55/CD59 клеток, но не от уровня CD20, таким образом, что повышенная экспрессия CD55/CD59 на клетках-мишенях ингибировала CDC.

Антитела против CD20 (контроль IV и контроль III [ритуксимаб]) являлись более эффективными по сравнению с антителами против CD20×CD3 (BS3/20-007) в отношении опосредования CDC, т.к. биспецифическое антитело является одновалентным для CD20. Однако в отличие от CDC, опосредованная Т-клетками цитотоксичность не зависела от уровней CD20 или CD55/CD59, т.к. все линии клеток являлись в равной степени подверженными гибели клеток, обусловленной активированными Т-клетками в присутствии биспецифического антитела против CD20×CD3. Кроме того, биспецифическое антитело являлось в 100-1000 раз более эффективным в отношении опосредования зависящего от Т-клеток цитолиза клеток Raji по сравнению с антителом против CD20 в анализе CDC.

Пример 12. Повышение экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках зависит от концентрации CD20 в случае присутствия биспецифических антител против CD20×CD3

Для оценки, будут ли приводить более высокие концентрации клетки-мишени (CD20+ лимфомы) к повышенной активности биспецифических антител CD20×CD3, мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) совместно культивировали в присутствии линии клеток, получаемой из лимфомы Беркитта, например, Raji.

Повышение экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках определяли с использованием следующего протокола: PBMC человека ( $5 \times 10^5$ /мл), выделяемые центрифугированием обогащенного мононуклеарными клетками продукт лейкофереза, получаемого из крови в избытке фиколла, инкубировали в присутствии ( $1 \times 10^5$ /мл) или отсутствии клеток Raji при 37°C в 96-луночных плоскодонных планшетах с 5-кратными серийными разведениями биспецифических антител. Через 48 ч клетки промывали 2 раза, блокировали в течение 10 мин при комнатной температуре с блокирующим реагентом hFcR, а затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C с непосредственно конъюгированными антителами против CD2, CD19, CD4, CD8 и CD25. После окрашивания клетки дважды промывали перед получением данных с использованием FACS посредством цитометра FACSCanto и анализом с использованием программного обеспечения

FlowJo. Процент активированных CD2+CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CD25, наносили на график в зависимости от концентрации антитела и рассчитывали значения EC<sub>50</sub> с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism. Результаты представлены в табл. 26.

Таблица 26. Повышение экспрессии CD25 на CD8+ Т-клетках после инкубации PBMC человека с биспецифическими антителами против CD20×CD3 плюс или минус клетки Raji

Антитело	PBMC		PBMC + Raji	
	EC <sub>50</sub> (M)	Максимальный % CD25+	EC <sub>50</sub> (M)	Максимальный % CD25+
BS3/20-001	1,12E-10	14,2	1,35E-12	92,2
BS3/20-003	3,65E-10	21,1	3,38E-13	94,4

Как представлено в табл. 26, для активированных Т-клеток при культивировании в присутствии клеток Raji (мишени) демонстрировали повышение экспрессии CD25 и последующее уменьшение в 100 раз их значений EC<sub>50</sub>.

Пример 13. Биспецифические антитела CP20×CD3 индуцируют цитотоксичность в отношении клеток Raji в присутствии активированных Т-клеток

В анализе цитотоксичности *in vitro* тестировали способность биспецифических антител CD20×CD3 перенаправлять опосредованный Т-клетками цитолиз на экспрессирующие CD20 клетки Raji. Кроме того, также исследовали способность биспецифических и исходных антител против CD3 уничтожать клетки U937 посредством взаимодействий Fc/FcR.

Анализы обусловленного кальцеином цитолиза проводили с использованием следующего протокола: PBMC человека и яванского макака выделяли в избытке фиколл-пак или с использованием среды для выделения клеток млекопитающих лимфоцит, соответственно. Выделенные PBMC активировали в течение нескольких суток средой, содержащей рекомбинантный IL-2 человека (30 Ед/мл) и гранулами для активации Т-клеток (антитела против CD3/CD28 для PBMC человека, антитела против CD2/CD3/CD28 для PBMC яванского макака).

Клетки-мишени (Raji для опосредованного CD20 цитолиза и U937 для опосредованного FcR цитолиза) метили кальцеином и инкубировали с активированными Т-клетками при отношении эффектор:мишень 10:1 с использованием 3-кратных серийных разведений антител в течение 3 ч при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали и переносили супернатанты в прозрачный черный планшет с чистым дном для флуоресцентного анализа. EC<sub>50</sub>, определяемые как молярная концентрация биспецифического антитела, которая индуцирует 50% цитотоксичность, определяли с использованием Prism. Значения рассчитывали с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа. Результаты обобщены в табл. 27.

Таблица 27. Значения EC<sub>50</sub> для индуцируемой CD20×CD3 цитотоксичности для клеток Raji и U937

Антитело	Цитотоксичность для Raji Т- клеток человека [M]	Цитотоксичность для U937 Т- клеток человека [M]	Цитотоксичность для Raji Т- клеток обезьяны [M]
Контроль I (антитело против CD3)	NA	3,04E-12	NA
BS3/20-001	5,63E-11*	8,86E-11*	1,27E-12*
BS3/20-002	7,71E-11*	8,24E-10	NT
BS3/20-003	7,38E-11*	8,10E-11*	4,36E-14
BS3/20-004	1,29E-11*	6,07E-11	NT
BS3/20-005	1,95E-11	1,48E-10	NT

(\*) Данные представляют собой медианные значения 3 или более независимых анализов. Данные без (\*) представляют собой характерные/средние значения 1 или 2 независимых анализов. NA=отсутствие активности; NT=не тестировали.

Как представлено в табл. 27, биспецифические антитела CD20×CD3, содержащие плечи, специфические к CD3 человека или дающие перекрестную реакцию с CD3 человека/яванского макака, оказались способными специфически перенаправлять цитотоксичность на клетки Raji в присутствии активирован-



ных Т-клеток человека. В присутствии активированных Т-клеток яванского макака Raji гибли, когда их инкубировали с BS3/20-001 или BS3/20-003, биспецифическими антителами, которые содержат плечи против CD3, которые активируют Т-клетки обезьяны. Все биспецифические антитела, а также контроль I, mAb против CD3, обладали активностью в анализе Fc/FcR-зависимого цитолиза U937. Эту активность можно было блокировать добавлением в реакцию блокирующего неспецифического IgG человека (данные не показаны).

Пример 14. Биспецифические антитела CD3×CD20 могут подавлять CD19+ В-клетки у мышей с восстановленным иммунными клетками человека иммунитетом

Для определения эффективности введения *in vivo* биспецифического антитела CD3×CD20 анализировали изменения уровней CD19+ В-клеток и CD2+ Т-клеток посредством FACS после введения 10 мкг или 0,1 мкг биспецифического антитела против CD3×CD20 мышам, которым восстанавливали иммунными клетками человека иммунитет.

В кратком изложении, новорожденных мышей BALB/Rag2<sup>null</sup>/Yc<sup>null</sup> облучали 2×150 Рад и восстанавливали иммунитет 4×10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup> гемопоэтическими клетками-предшественниками человека посредством внутривенной инъекции. Через 12 недель определяли композицию восстановленной иммунной системы человека в периферической крови проточной цитометрией. Как правило, через три месяца после восстановления 10-60% процентов лейкоцитов периферической крови являлись CD45+ человека, из которых 40-70% представляют собой В-клетки, 15-40% представляют собой Т-клетки, оставшиеся и сохранившиеся представляют собой небольшие популяции природных киллеров и дендритных клеток.

Через пять месяцев после восстановления мышам интраперитонеально инъецировали 10 или 0,1 мкг биспецифического антитела против CD3×CD20 BS3/20-007, 10 мкг одновалентного антитела против CD3 с 1 плечом (BS3/20-009, см. табл. 1) или 10 мкг контроля с нерелевантным изотипом hIgG. Через одни, восемь и двадцать-пять суток после инъекции у мышей брали образец крови из ретроорбитального синуса и определяли популяции иммунных клеток в периферической крови проточной цитометрией (FACS).

Для анализа FACS 100 мкл крови инкубировали с 1,5 мл буфера для лизиса RBC в пробирках Eppendorf в течение 3 мин. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 0,4×g, промывали 2 раза промывающим раствором для FACS (PBS+3%FBS) и блокировали в течение 10 мин при комнатной температуре с блокирующим Fc мыши реагентом. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с непосредственно мечеными антителами против CD2, CD3, CD19, CD4, CD8, hCD45, hHLA-DR и mCD45. После окрашивания клетки два раза промывали перед получением данных FACS посредством цитометра FACSCanto и анализа с использованием программного обеспечения FlowJo. Результаты представлены в табл. 28.

Таблица 28. Процент циркулирующих CD45-, CD19- и CD2-положительных клеток у мышей с восстановленным иммунными клетками человека иммунитетом

ID мыши	Контрольный изотип (10 мкг)	BS3/20-007 (10 мкг)		BS3/20-007 (0,1 мкг)			BS3/20-009 [одно плечо CD3] (10 мкг)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сутки										
%huCD45+	До	13,7	14,8	16,1	30,9	37,2	22,5	25,5	26,6	33,3
	1 с	7,7	10,8	0,01	0,13	1,7	1,2	0,8	2,7	8,9
	8 с	14,1	12,7	0,12	0,16	3,3	7,7	3,9	3,2	4,5
	25 с	13,0	7,3	0,15	0,12	9,0	1,2	1,0	2,8	5,1
%CD19+ (huCD45+)	1 с	58,7	66,8	0,00	7,69	20,2	7,0	5,2	75,3	87,1
	8 с	66,2	56,2	0,00	0,00	21,3	0,4	0,0	70,4	76,6
	25 с	37,3	62,8	9,7	2,6	58,3	0,7	0,6	38,9	51,3
%CD2+ (huCD45+)	1 с	58,7	66,8	0,00	7,69	20,2	7,0	5,2	75,3	87,1
	8 с	66,2	56,2	0,00	0,00	21,3	0,4	0,0	70,4	76,6
	25 с	37,3	62,8	9,7	2,6	58,3	0,7	0,6	38,9	51,3

Как представлено в табл. 28, однократная доза 10 мкг биспецифического антитела против CD3×CD20 BS3/20-007 приводила к исчезновению циркулирующих hCD45+ клеток у 2 из 2 обрабатываемых мышей, которые не восстанавливались в течение всего эксперимента. Однократная доза 0,1 мкг BS3/20-007 снижала число циркулирующих hCD45+ клеток, включая CD19+ В-клетки и CD2+ Т-клетки через 24 ч после инъекции у 2 из 3 обрабатываемых мышей. После снижения числа процент hCD45+ клеток существенно не восстанавливался у реагирующих мышей, которых обрабатывали 0,1 мкг BS3/20-007. Однако те клетки, которые остались у этих мышей, представляли собой преимущественно hCD2+ Т-клетки, и CD19+ В-клетки не содержались у реагирующих мышей даже через 25 суток после обработки. Однократная доза 10 мкг одновалентного антитела с 1 плечом против с CD3 (BS3/20-009) также приво-

дила к устойчивому, но умеренному снижению числа CD45+ клеток, в частности CD2+ Т-клеток, у 2 из 2 обрабатываемых мышей. Однократная доза 10 мкг контроля с нерелевантным изотипом hIgG1 не имела достоверного эффекта на процент циркулирующих клеток hCD45+, hCD19+ или hCD2+.

Пример 15. Обработка биспецифическим антителом CP20×CD3 уменьшает объем опухоли из клеток Raji у мышей NOD/SCID

Для оценки эффективности отобранных биспецифических антител против CD3×CD20 в отношении снижения роста опухоли из клеток Raji, мышам NOD/SCID (Taconic) подкожно имплантировали смесь  $2 \times 10^6$  опухолевых клеток Raji и  $8 \times 10^6$  PBMC человека. Мышей обрабатывали три раза в неделю, начиная на сутки имплантации опухоли, Fc человека (hFc) или биспецифическим антителом CD3×CD20 (BS3/20-007) в дозе 1 мкг на мышь (N=20 мышей в группе обработке). Реагенты поставляли посредством интраперитонеальной (и/п) инъекции. Размер опухоли измеряли три раза в неделю с использованием циркулей и вычисляли объем опухоли как  $\text{объем} = (\text{длина} \times \text{высота}^2) / 2$ . Результаты представлены на фиг. 1.

Во втором эксперименте мышам NOD/SCID подкожно имплантировали смесь  $2 \times 10^6$  опухолевых клеток Raji и  $4 \times 10^6$  PBMC человека. Обработку биспецифическим антителом CD3×CD20 (BS3/20-007) или контрольным реагентом (hFc) начинали через 7 суток после имплантации опухоли, чтобы опухоли стали прощупываемыми. Мышей обрабатывали два раза в неделю в дозе 1 мкг на мышь (N=6 мыши в группе обработки). Реагенты инъецировали подкожно, в стороне от участка имплантации опухоли. Размер опухоли измеряли два раза в неделю с использованием циркулей и вычисляли объем опухоли как  $\text{объем} = (\text{длина} \times \text{высота}^2) / 2$ . Результаты представлены на фиг. 2.

Этот пример демонстрирует, что обработка биспецифическим антителом CD3×CD20 BS3/20-007 являлась эффективной в отношении ингибирования роста опухоли как в момент имплантации опухоли, так и после того, как опухоли сформировались. Объем опухоли у мышей уменьшался на 25 суток после имплантации в обоих исследованиях относительно контроля.

Пример 16. Биспецифические антитела CP20×CD3 уменьшают популяции В-клеток у Яванских макаков и обладают фармакокинетическим профилем, типичным для моноклональных антител

Предварительное не соответствующее GLP и фармакологическое исследование проводили на яванских макаках (*Macaca fascicularis*) для определения способности биспецифических антител CD3×CD20 уменьшать популяции В-клеток у этих животных. Самцов животных распределяли на три когорты. Когорта 1 получали биспецифическое антитело BS3/20-001 и включала три различные группы дозирования (0,01, 0,10 и 1,00 мг/кг) с 3-4 животными в группе дозирования. Когорта 2 представляла собой когорту из двух животных, которые получали низкую дозу контрольного антитела против CD20 (контроль V, 0,01 мг/кг). Когорта 3 представляла собой когорту из четырех животных, которые получали высокую дозу контрольного антитела против CD20 (контроль III, 1,0 мг/кг). Кровь собирали на сутки -7 и непосредственно перед дозированием для установления фоновых уровней В- и Т-клеток у этих животных. Лекарственное средство в дозах 0,01, 0,10 или 1,00 мг/кг вводили посредством в/в инфузии и собирали кровь через 5 мин, 5 ч и 1, 4, 7 и 14 суток после дозирования. Через сутки 14 суток после дозирования собирали кровь каждые две недели до завершения исследования. Образцы крови анализировали посредством FACS на маркеры В- и Т-клеток и определяли абсолютное число этих типов клеток. Образцы сыворотки также анализировали на уровни цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6 и TNF $\alpha$ ) стандартными аналитическими способами. Результаты представлены на фиг. 3 (В-клетки), фиг. 4 (Т-клетки) и фиг. 5А-5D (цитокнины).

Как продемонстрировано в этом примере введение биспецифического антитела CD3×CD20 приводило к снижению числа циркулирующих В-клеток до фоновых уровней в первый измеряемый момент времени (сутки 1). Такое уменьшение не наблюдали в когорте контрольных животных. Снижение числа В-клеток в когорте биспецифического антитела сохранялось до двух недель после дозирования и в когортах дозы 0,01 и 0,10 мг/кг сопровождалось постепенным восстановлением уровней В-клеток до тех пор, пока эксперимент не был завершён приблизительно через 11 недель после дозирования. Однако в когорте 1,0 мг/кг не наблюдали восстановления уровней В-клеток в течение всего срока эксперимента (11 недель). В этом эксперименте также наблюдали за уровнями Т-клеток. Временное снижение числа циркулирующих Т-клеток наблюдали на 1 сутки после дозирования в когортах биспецифического антитела. Уровни Т-клеток возвращались к фоновым уровням в этих когортах на момент времени 4 суток и сохранялись на фоновых уровнях до конца эксперимента. Кроме того, для уровней цитокинов в сыворотке для BS3/20-001 через 5 ч демонстрировали дозозависимый и зависящий от времени ответ, который соответствует активации Т-клеток (см. фиг. 5А-5D).

Во время эксперимента также анализировали уровни экспрессии генов в периферической крови. У животных получали образцы крови в два момента времени до дозирования (сутки 7 до дозирования и непосредственно перед дозированием) и через 5, 24, 72, 96 и 168 ч после дозирования. Из этих образцов выделяли РНК и анализировали посредством микрочипа. При сравнении с уровнями до дозирования и уровнями экспрессии генов контрольной группы наблюдали заметное снижение экспрессии гена маркеров В-клеток у животных, которых обрабатывали биспецифическим антителом; этот эффект являлся подобным эффекту, наблюдаемому в образцах, получаемых у животных, которых обрабатывали 1,0 мг/кг контроля III (антитело против CD20, соответствующее ритуксимабу). Наблюдаемое изменение экспрес-

сии маркеров В-клеток соответствует снижению числа В-клеток, детектируемых в крови обрабатываемых животных. Для экспрессии генов маркеров Т-клеток в образцах у животных, обрабатываемых биспецифическим антителом CD3×CD20, демонстрировали первоначальное снижение с последующим возвращением к нормальным уровням через 24 ч. Кроме того, для генов, ассоциированных с воспалительным ответом, демонстрировали первоначальное повышение экспрессии у животных в когорте биспецифического антитела, но возвращение к нормальным уровням или ниже через 24 ч. Наконец, анализ необработанных данных интенсивности сигнала экспрессии гена CD20 позволяет предположить, что большее снижение числа В-клеток возникает в результате обработки животных биспецифическим антителом CD3×CD20 по сравнению с контрольными антителами против CD20. (см. фиг. 6 и табл. 29).

Таблица 29. Уровни экспрессии гена CD20 на 7 сутки

Антитело	Доза мг/кг	Экспрессия CD20 (Интенсивность без обработки)
Контроль V (антитело против CD20)	0,01	26485,44
	0,01	24335,17
Контроль III (антитело против CD20)	1,0	1813,46
	1,0	47,09
	1,0	98,88
BS3/20-001	1,0	70,52
	0,01	24,93
	0,01	226,45
	0,01	4,78
	0,01	8,12
	0,1	8,26
	0,1	5,62
	0,1	4,82
	0,1	23,61
	1,0	9,38
1,0	9,19	
1,0	8,22	

Как представлено в табл. 29, на седьмые сутки после дозирования интенсивность сигнала CD20 без обработки оставалась на фоновых уровнях у всех животных, кроме одного, группы CD3×CD20, тогда как для 3 из 4 животных, обрабатываемых 1 мг/кг контроля III, демонстрировали незначительные или детектируемые уровни сигнала CD20.

В этом же эксперименте оценивали фармакокинетический профиль биспецифического антитела (фиг. 7) путем получения образцов крови до дозирования и через 0,083, 5, 24, 48, 72, 168, 336, 504 и 840 ч. Для определения концентрации общего биспецифического антитела получаемые образцы сыворотки анализировали прямым твердофазным иммуферментным анализом (ELISA). Для определения фармакокинетических параметров данные концентрации общего биспецифического антитела (BS3/20-001) в сыворотке анализировали анализом без учета компартментов (Phoenix WinNonLin). Результаты представлены в табл. 30 (AUC=площадь под кривой в зависимости от времени;  $C_{max}$ =максимальная концентрация соединения, наблюдаемая в представляющей интерес матрице).

Таблица 30. Фармакокинетические параметры BS3/20-001 у яванского макака

Параметр	Единицы	0,01 мг/кг		0,10 мг/кг		1,0 мг/кг	
		Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
$C_{max}$	мкг/мл	0,261	0,0413	2,32	0,274	33,4	4,20
$C_{max}/\text{Доза}$	кг*мкг/мл/ мг	26,1	4,13	23,2	2,74	33,4	4,20
$t_{max}$	часы	0,083	0,00	0,083	0,00	0,083	0,00
AUC <sub>всe</sub>	мкг*час/мл	4,42	2,37	289	87,2	4940	1080
AUC <sub>всe</sub> / доза	час*кг*мкг/ мл/мг	442	237	2890	872	4940	1080

После однократной внутривенной дозы 0,01, 0,10 или 1,0 мг/кг BS3/20-001 в первый момент времени забора проб (0,083 часов) у яванских макаков наблюдали основные пиковые концентрации ( $C_{max}$ ) 0,261, 2,32 и 33,4 мкг/мл, соответственно. Средние значения AUC<sub>всe</sub> 4,42, 289 и 4940 мкг\*час/мл наблюдали при дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мг/кг. Нормализованные на дозу значения AUC (AUC<sub>всe</sub>/доза) 442, 2890 и 4940

мкг\*час/мл на мг/кг свидетельствуют о том, что плазма экспонирование ( $AUC_{\text{всe}}$ ) увеличивается с увеличением дозы нелинейным образом. Более чем пропорциональное увеличение экспонирования лекарственного средства в плазме наблюдали при увеличивающейся дозе антитела, подтверждая, что BS3/20-001 может подвергаться некоторому опосредованному мишенью клиренсу. Общий фармакокинетический профиль BS3/20-001 является характерным для моноклональных антител, дозируемых яванскому макаку.

Настоящее изобретение не ограничено в своем объеме конкретными вариантами осуществления, описываемыми в настоящем описании. Фактически, различные модификации по изобретению в дополнение к модификациям, описываемым в настоящем описании, станут понятны специалистам в данной области из указанного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагают, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит
  - вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую определяющие комплементарность области A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3, и
  - вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую определяющие комплементарность области A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3,
  - где определяющие комплементарность области содержатся в паре HCVR/LCVR, содержащей аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 1250/1258, 1266/1274 или 1282/1290,
  - где биспецифическая антигенсвязывающая молекула индуцирует пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека и яванского макака *in vitro*.
2. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD20 человека, содержит
  - HCVR, содержащий определяющие комплементарность области A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3, содержащиеся в HCVR, содержащем SEQ ID NO: 1242, и
  - LCVR, содержащий определяющие комплементарность области A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3, содержащиеся в LCVR, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1258, 1274 или 1290.
3. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2, в которой
  - A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1268, 1270 и 1272 соответственно;
  - A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1276, 1278 и 1280 соответственно;
  - A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1244, 1246 и 1248 соответственно; и
  - A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1276, 1278 и 1280 соответственно.
4. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2, где
  - A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1284, 1286 и 1288 соответственно;
  - A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1292, 1294 и 1296 соответственно;
  - A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1244, 1246 и 1248 соответственно; и
  - A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1292, 1294 и 1296 соответственно.
5. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2, в которой
  - первый антигенсвязывающий домен содержит
  - вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1250, и
  - вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1258; и
  - второй антигенсвязывающий домен содержит
  - HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1242, и
  - LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1258.
6. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2, где первый антигенсвязывающий домен содержит
  - вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 1266, и

вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1274; и

где второй антигенсвязывающий домен содержит

HCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1242, и

LCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1274.

7. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2,

где первый антигенсвязывающий домен содержит

вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1282, и

вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1290; и

где второй антигенсвязывающий домен содержит

HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1242, и

LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1290.

8. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-7, которая представляет собой биспецифическое антитело.

9. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.8, которая содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

11. Способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования у пациента, включающий введение субъекту биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10.

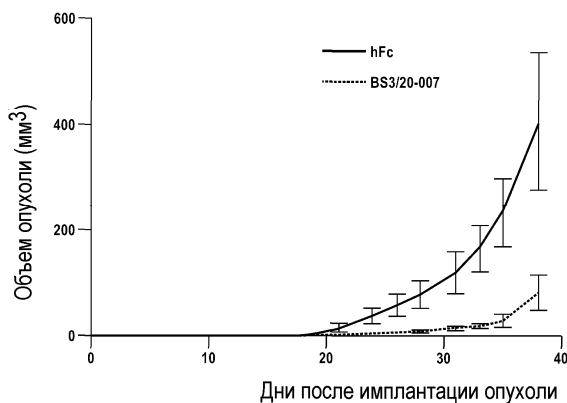
12. Способ по п.11, в котором В-клеточное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточной лимфобластной лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфомы мантийных клеток, волосатоклеточного лейкоза и лимфомы Беркитта.

13. Способ по п.11 или 12, в котором пациент страдает опухолью, которая устойчива или не полностью реагирует на моноспецифическую терапию против CD20.

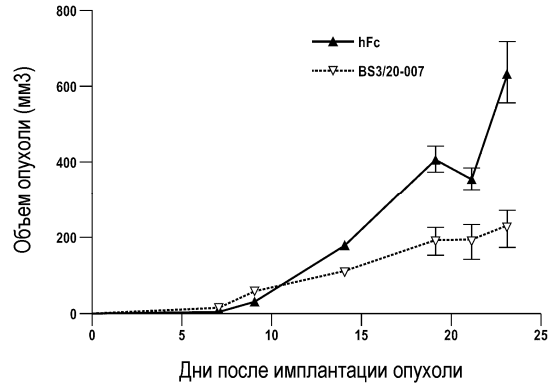
14. Способ по любому из пп.11-13, в котором пациент получал терапию моноспецифическим антителом против CD20 в течение по меньшей мере от 1 суток до 1 года до введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы или фармацевтической композиции.

15. Способ по п.14, в котором моноспецифическая терапия против CD20 включает или состоит из моноспецифического антитела против CD20.

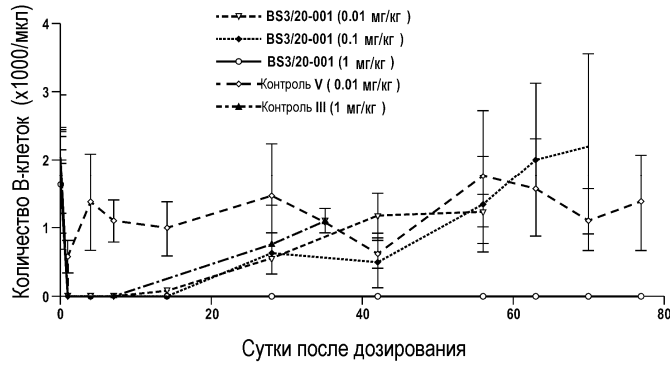
16. Способ по п.15, в котором моноспецифическим антителом против CD20 является ритуксимаб.



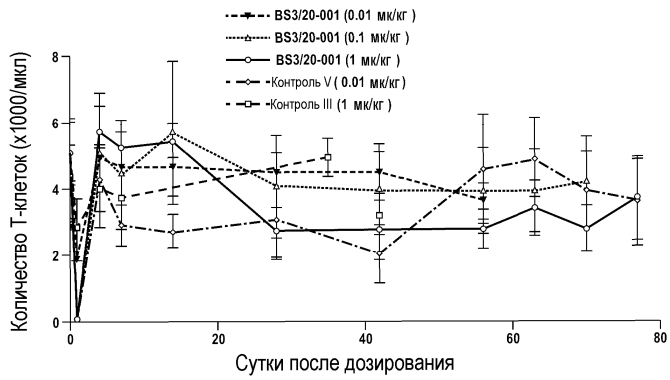
Фиг. 1



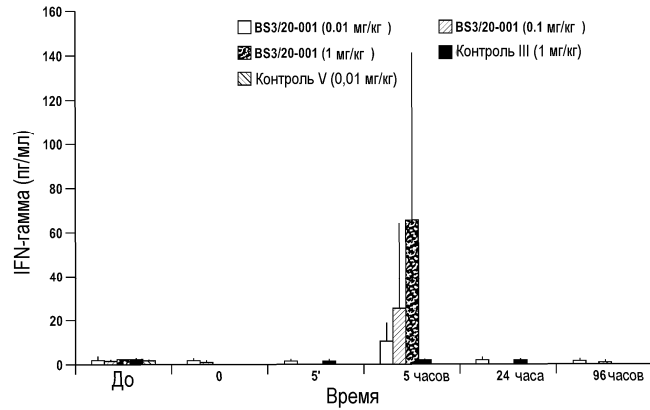
Фиг. 2



Фиг. 3

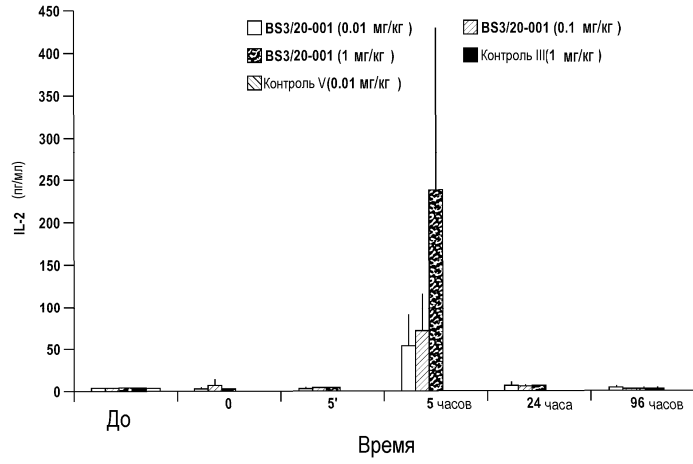


Фиг. 4

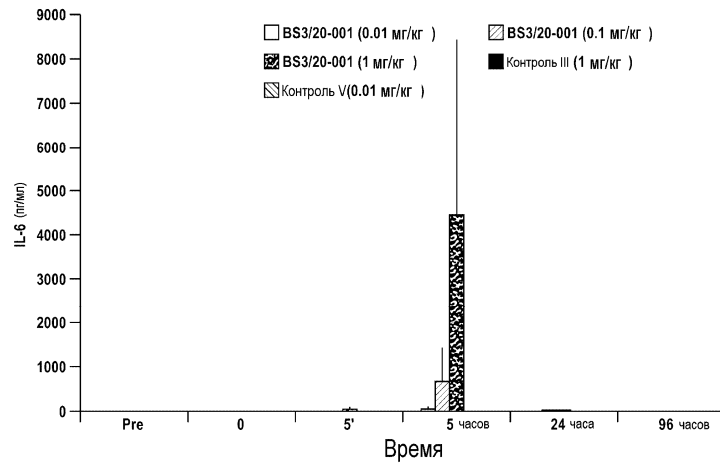


Фиг. 5А

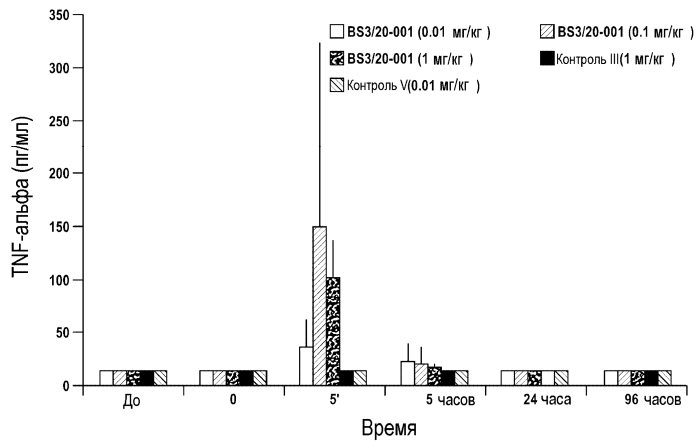
046708



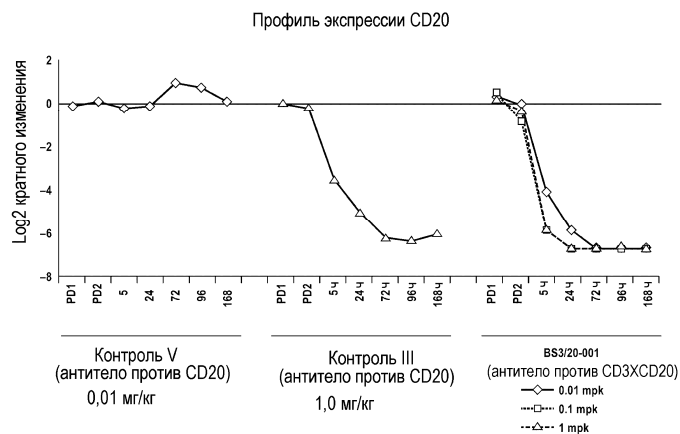
Фиг. 5B



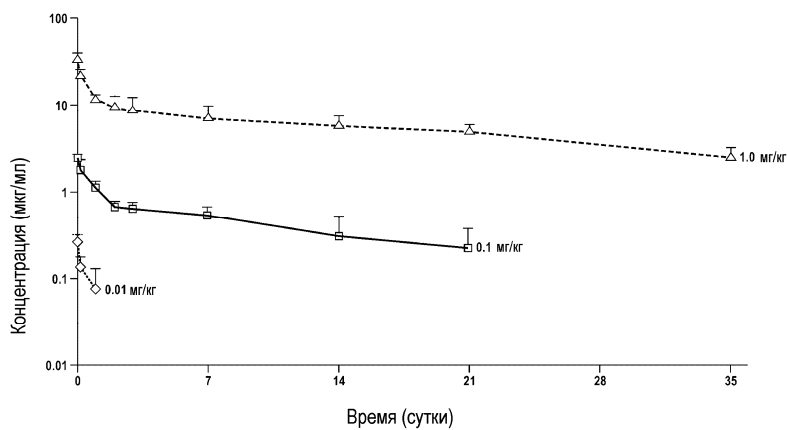
Фиг. 5C



Фиг. 5D



Фиг. 6



Фиг. 7

