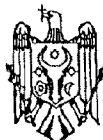




MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3515487 (13) T2

(51) Int. Cl:A61K 39/395 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 16/30 (2006.01.01)
C07K 16/44 (2006.01.01)
C07K 16/46 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0826 (22) Data de depozit: 2017.09.22 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17784089.9, 2017.09.22 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3515487, 2019.07.31 (31) Numărul cererii prioritare: 201662399249 P; 201762558711 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.09.23; 2017.09.14 (33) Țara cererii prioritare: US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 11/2023, 2023.11.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 29/2023, 2023.07.19 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2019, 2019.09.30
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventatori: HABER Lauric, US; SMITH Eric, US; KELLY Marcus, US; KIRSHNER Jessica R., US; COETZEE Sandra, US; CRAWFORD Alison, US; NITTOLI Thomas, US; LIU Yashu, US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Anticorpi bispecfici anti-MUC16-CD3 și conjugate anticorp anti-MUC16-medicament

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție se referă la anticorpi anti-mucină 16: anticorpi bispecfici (bsAbs) care se leagă atât la MUC16, cât și la CD3 și activează celulele T prin intermediul complexului CD3 în prezența tumorilor care exprimă MUC16, anticorpi IgG umani care se leagă la andMUC16 umani (anticorpi monospecfici), anticorpi anti-MUC16

2
conjugată cu medicamente care inhibă creșterea tumorală in vivo. Anticorpii sunt utili pentru tratamentul diferitelor tipuri de cancer, inclusiv al cancerului ovarian.

Revendicări: 14

Figuri: 12

MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

(54) Bi specific anti-MUC16-cd3 antibodies and anti-MUC16 drug conjugates

(57) Abstract:

1

The present disclosure provides anti mucin 16 antibodies : bispecific antibodies (bsAbs) that bind to both MUC16 and CD3 and activate T cells via the CD3 complex in the presence of MUC16-expressing tumors. human IgG antibodies that bind to human andMUC16 (monospecific antibodies) anti-

2

MUC16 antibody drug conjugates which inhibit tumor growth in vivo The antibodies are useful for the treatment of various cancers, including ovarian cancer.

Claims: 14

Fig.: 12

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENTIEI**

Prezenta invenție se referă, la anticorpi bispecfici sau fragmente de legare la antigen ai acestora care leagă (MUC16) și CD3 și metode de utilizare a acestora.

STADIUL TEHNICII

Mucina 16 (MUC16), cunoscută și sub denumirea de antigen de cancer 125, antigen de carcinom 125, antigen de carbohidrați 125 sau CA-125, este o glicoproteină membranară integrală cu un singur domeniu transmembranar foarte glicozilat, care este foarte exprimată în cancerul ovarian. MUC16 constă din trei domenii majore: un domeniu N-terminal extracelular, un domeniu mare repetat în tandem intercalate cu domenii de spermă de arici de mare, enterokinază și agrină (SEA) și un domeniu carboxil terminal care cuprinde un segment al regiunii transmembranare și o coadă citoplasmatică scurtă. Clivajul proteolitic are ca rezultat eliminarea unei mari părți a porțiunii extracelulare a MUC16 în fluxul sanguin. MUC16 este supraexprimat în tipuri de cancer, inclusiv cancer ovarian, cancer de sân, cancer pancreatic, cancer pulmonar fără celule mici, colangiocarcinom intrahepatic cu formare de masă, adenocarcinom al colului uterin și adenocarcinom al tractului gastric, precum și în boli și afecțiuni, inclusiv inflamatorii. boli intestinale, ciroză hepatică, insuficiență cardiacă, infecție peritoneală și intervenții chirurgicale abdominale. (Haridas, D. și colab., 2014, FASEB J., 28:4183-4199). Expresia pe celulele canceroase este demonstrat că protejează celulele tumorale de sistemul imunitar. (Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13: 129) Au fost investigate metode de tratare a cancerului ovarian folosind anticorpi la MUC16. Oregovomab și abgovomab sunt anticorpi anti-MUC16 care au avut un succes limitat. (Felder, supra, Das, S. și Batra, S. K. 2015, Cancer Res. 75:4660-4674.)

CD3 este un antigen homodimeric sau heterodimeric exprimat pe celulele T în asocieri cu complexul receptor al celulelor T (TCR) și este necesar pentru activarea celulelor T. CD3 funcțional este format din asocierea dimerică a două din cele patru lanțuri diferite: epsilon, zeta, delta și gamma. Aranjamentele dimerice CD3 includ gama/epsilon, delta/epsilon și zeta/zeta. S-a demonstrat că anticorpii împotriva CD3 grupează CD3 pe celulele T, provocând astfel activarea celulelor T într-un mod similar cu angajarea TCR de către moleculele MHC încărcate cu peptide. Astfel, anticorpii anti-CD3 au fost propuși în scopuri terapeutice care implică activarea celulelor T. În plus, anticorpii bispecfici care sunt capabili să lege CD3 și un antigen țintă au fost propuși pentru utilizări terapeutice care implică țintirea răspunsurilor imune ale celulelor T la țesuturi și celule care exprimă antigenul țintă. Următorul document este relevant pentru stadiul tehnicii: WO2016149368, „Anticorpi anti-MUC16 și utilizări ale acestora”, publicat pe 22 septembrie 2016.

Moleculele care leagă antigenul care țintesc MUC16, inclusiv conjugatii anticorp-medicament, precum și moleculele bispecifice care leagă antigenul care leagă atât MUC16, cât și CD3 ar fi utile în setările terapeutice în care țintirea specifică și uciderea mediată de celulele T a celulelor care exprimă MUC16 sunt utile. dorit.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Într-un prim aspect, prezenta invenție furnizează anticorpi bispecfici și fragmente de legare la antigen ale acestora care se leagă la MUC16 uman și CD3 uman. Anticorpii bispecfici sunt utili, *inter alia*, pentru țintirea celulelor T care exprimă CD3 și pentru stimularea activării celulelor T, de exemplu, în circumstanțe în care uciderea mediată de celule T a celulelor care exprimă MUC16 este benefică sau de dorit. De exemplu, anticorpii bispecfici pot direcționa activarea celulelor T mediată de CD3 către celule specifice care exprimă MUC16, cum ar fi celulele tumorale ovariene. Anticorpii sau fragmentele acestora de legare la antigen, cuprind un domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman și cuprinde setul de secvențe de aminoacizi de HCDR1-HCDR2-HCDR3- LCDR1-LCDR2-LCDR3 ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32 (de exemplu, H1 H8767P). Invenția furnizează de asemenea compoziții farmaceutice care cuprind anticorpii bispecfici. Invenția este definită prin revendicări.

REZUMATUL ÎNVĂȚĂTURILOR TEHNICE

Informațiile tehnice prezentate mai jos pot, în unele privințe, să depășească invenția, care este definită exclusiv de revendicările anexate. Informațiile tehnice suplimentare sunt furnizate pentru a plasa invenția reală într-un context tehnic mai larg și pentru a ilustra posibilele dezvoltări tehnice conexe. Astfel de informații tehnice suplimentare care nu intră în sfera revendicărilor anexate, nu fac parte din invenție.

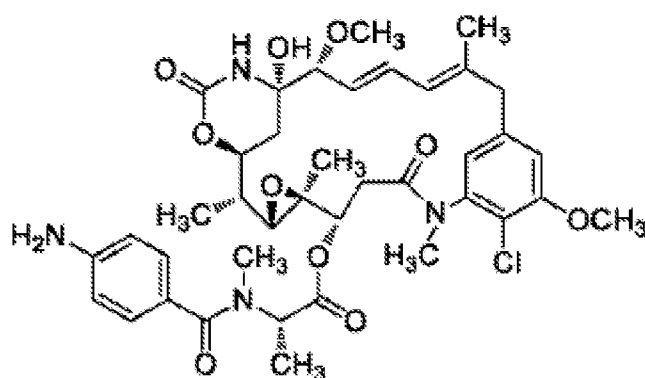
Anticorpusul izolat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia din prezenta dezvăluire leagă MUC16 uman în unul sau mai multe dintre cele cinci domenii SEA proximale ale membranei ale MUC 16 uman (SEQ ID NO: 1899). Cele cinci domenii SEA proximale ale membranei corespund resturilor

13791-14451 ale SEQ ID NO: 1899. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen se leagă cu un KD mai mic de aproximativ 60 nM, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmon de suprafață la 25° C. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen se leagă în resturile 14237 până la 14290 din SEQ ID NO: 1899. De exemplu, al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16 uman poate cuprinde o pereche HCVR/LCVR care cuprinde secvențele de aminoacizi. din SEQ ID NO: 18/26.

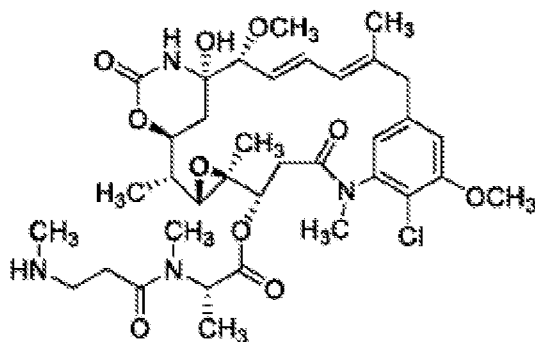
Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen din prezenta dezvăluire pot fi utilizați în conjugate anticorp-medicament cuprinzând anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestora și un agent terapeutic (de exemplu, un agent citotoxic). În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen și agentul citotoxic sunt atașați covalent printr-un linker, așa cum s-a discutat aici.

În unele cazuri, agentul citotoxic este selectat dintre o auristatină, un maitansinoid, o tubulizină, o tomamycină derivată sau un derivat al dolastatinei. În unele cazuri, agentul citotoxic este o auristatină selectată dintre MMAE sau MMAF, sau un maitansinoid selectat dintre DM1 sau DM4. În unele cazuri, agentul citotoxic este un maitansinoid având structura cu Formula (I) sau Formula (II), așa cum s-a discutat aici.

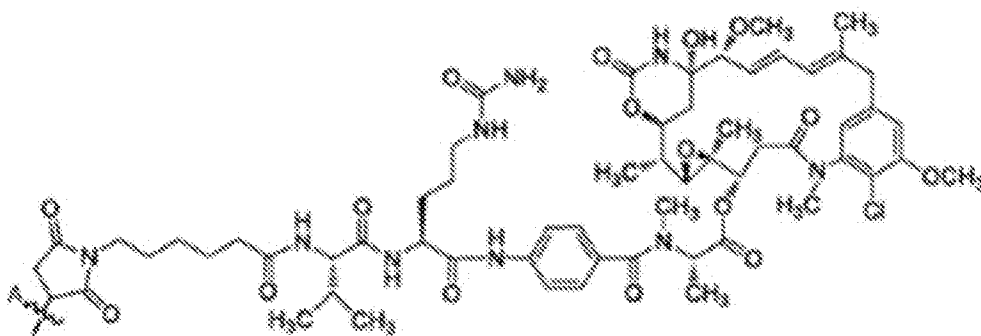
În unele cazuri, agentul citotoxic este un maitansinoid având structura:



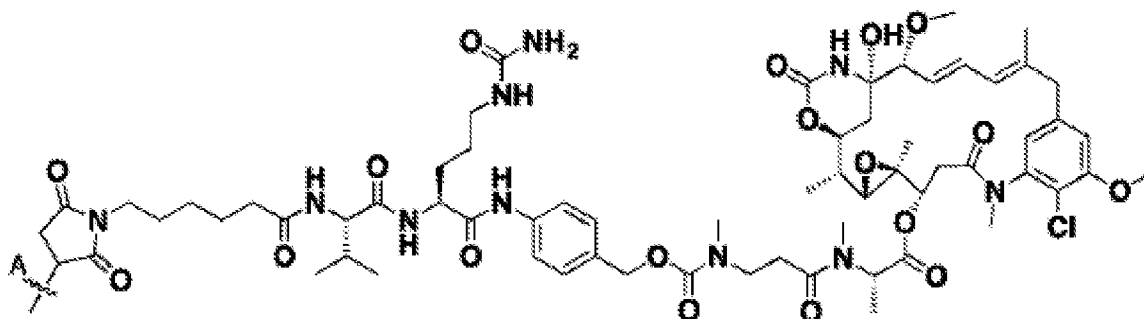
În unele cazuri, agentul citotoxic este un maitansinoid având structura:



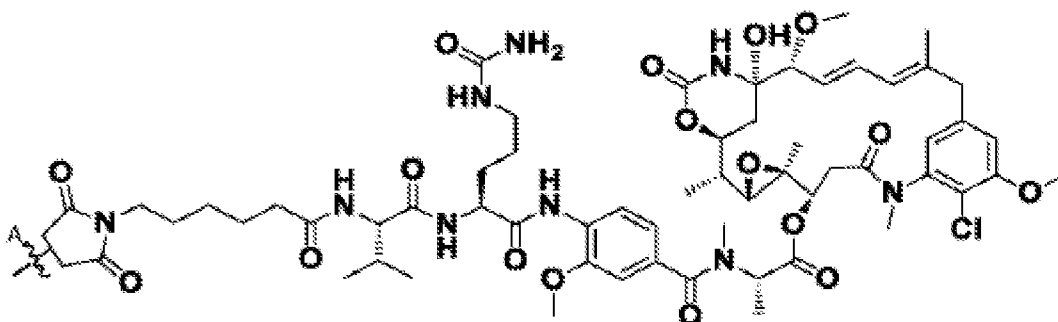
În unele cazuri, conjugatul anticorp-medicament cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia și



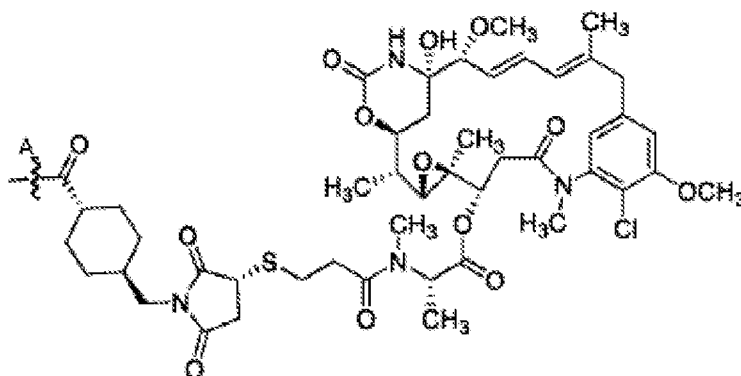
în care  este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragment al acestuia.
În unele cazuri, conjugatul anticorp-medicament cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia și

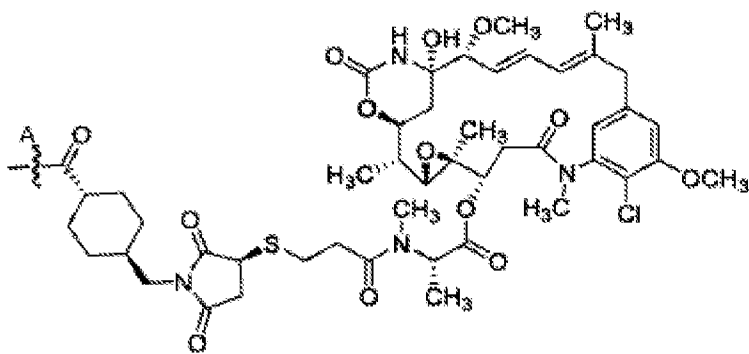


5 în care este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia.
În unele cazuri, conjugatul anticorp-medicament cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau fragment al acestuia, și



10 în care  este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragment al acestuia.
În unele cazuri, legătura intră în contact cu anticorpul sau fragmentul acestuia prin intermediul unui constituent de sulf al unui rest de cisteină.
În unele cazuri, conjugatul anticorp-medicament cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia și





sau un amestec al acestora,

în care  este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia.

În unele cazuri, legătura contactează anticorpul sau fragmentul acestuia prin intermediul unui
5 constituant de azot al unui rest de lizină.

În oricare dintre diferitele realizări ale conjugatelor anticorp-medicament discutate mai sus sau
aici, conjugatul anticorp-medicament poate cuprinde de la 1 până la 4 agenți citotoxici per anticorp anti-
MUC16 sau fragment al acestuia.

Prezenta invenție furnizează molecule bispecifice de legare a antigenului (de exemplu, anticorpi)
10 care leagă MUC16 și CD3. Astfel de molecule bispecifice de legare a antigenului sunt, de asemenea,
denumite aici "molecule bispecifice anti-MUC16/anti-CD3", "molecule bispecifice anti-CD3/anti-
MUC16" sau "bsAbs MUC16xCD3". „Porțiunea anti-MUC16 a moleculei bispecifice anti-MUC16/anti-
CD3 este utilă pentru țintirea celulelor (de exemplu, celule tumorale) care exprimă MUC16 (de exemplu,
15 tumori ovariene), iar porțiunea anti-CD3 a moleculei bispecifice este utilă. pentru activarea celulelor T.
Legarea simultană a MUC16 pe o celulă tumorală și CD3 pe o celulă T facilitează uciderea direcționată
(liza celulară) a celulei tumorale vizate de către celula T activată. Moleculele bispecifice anti-
MUC16/anti-CD3 ale dezvoltării sunt, prin urmare, utile, inter alia, pentru tratarea bolilor și tulburărilor
legate de sau cauzate de tumorile care exprimă MUC16 (de exemplu, cancerul ovarian).

Moleculele bispecifice de legare a antigenului conform acestui aspect al prezentei invenții
20 cuprind un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea
domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16, în care al doilea

domeniul de legare a antigenului cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-
LCDR2-LCDR3, respectiv, cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32..
Prezenta dezvoltare include molecule bispecifice anti-MUC16/anti-CD3 (de exemplu, anticorpi
25 bispecifice) în care fiecare domeniu de legare la antigen cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu
(HCVR) asociată cu o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR). În anumite cazuri exemplificative ale
dezvoltării, domeniul de legare a antigenului anti-CD3 și domeniul de legare a antigenului anti-MUC16
cuprind fiecare HCVR-uri diferite, distincte, asociate cu un LCVR comun. De exemplu, așa cum este
30 ilustrat în exemplul 3 de aici, anticorpii bispecifice au fost construiți cuprinzând un prim domeniu de
legare la antigen care leagă în mod specific CD3, în care primul domeniu de legare la antigen cuprinde un
HCVR derivat dintr-un anticorp anti-CD3 asociat cu un LCVR derivat dintr-un anticorp anti-MUC16 (de
exemplu, același LCVR care este inclus în domeniul de legare a antigenului anti-MUC16); și un al doilea
domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16, în care al doilea domeniu de legare a
35 antigenului cuprinde un HCVR/LCVR derivat dintr-un anticorp anti-MUC16. Cu alte cuvinte, în
moleculele exemplificative dezvoltate aici, împerecherea unui HCVR de la un anticorp anti-CD3 cu un
LCVR de la un anticorp anti-MUC16 creează un domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific
CD3 (dar nu leagă MUC16). În astfel de cazuri, primul și al doilea domeniu de legare la antigen cuprind
40 HCVR anti-CD3 și anti-MUC16 distincte, dar au o LCVR comună anti-MUC16. În alte cazuri,
moleculele bispecifice de legare a antigenului cuprind HCVR anti-CD3 și anti-MUC16 distincte, dar au o
LCVR comună. Șoarecii modificați genetic pot fi utilizați pentru a produce molecule de legare a
antigenului bispecific complet uman, cuprinzând două lanțuri grele diferite care se asociază cu un lanț
45 ușor identic care cuprinde un domeniu variabil derivat dintr-unul dintre cele două segmente ale genei
diferite ale regiunii variabile ale lanțului ușor uman. Alternativ, lanțurile grele variabile pot fi asociate cu
un lanț ușor comun și exprimate recombinant în celulele gazdă. Ca atare, anticorpii conform invenției pot
cuprinde lanțuri grele de imunoglobuline asociate cu un singur lanț ușor rearanjat. În unele cazuri, lanțul

ușor cuprinde un domeniu variabil derivat dintr-un segment de genă V_K1-39 umană sau un segment de genă V_K3-20. În alte cazuri, lanțul ușor cuprinde un domeniu variabil derivat dintr-un segment de genă umană V_K1-39 rearanjat cu un segment de genă umană J_K5 sau J_K1 umană.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR, oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR, perechi de secvențe acide, oricare dintre secvențele de aminoacizi a lanțului greu CDR1-CDR2-CDR3 sau oricare dintre secvențele de aminoacizi a lanțului ușor CDR1-CDR2-CDR3, așa cum este menționat în publicația SUA 2014/0088295 publicată pe 27 martie 2014 și PCT/US2016 /044732 depus la 29 iulie 2016.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, așa cum este prezentat în Tabelele 16, 18 și 22 de aici. Primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 poate cuprinde, de asemenea, oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR, așa cum sunt prezentate în Tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici. Conform anumitor cazuri, primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre perechile de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR așa cum este prezentat în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici. Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-MUC16, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi a lanțului greu CDR1-CDR2-CDR3, așa cum este prezentat în tabelele 16, 18 și 22 de aici și/sau oricare dintre secvențele de aminoacizi CDR1-CDR2-CDR3 ale lanțului ușor, așa cum sunt prezentate în Tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelele 16, 18, și 22 de aici sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 1, 6, 19, și 23 de aici, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde un HCVR și LCVR. perechea de secvențe de aminoacizi (HCVR/LCVR) așa cum este prezentat în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde un lanț greu CDR3 domeniu (HCDR3) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 16, 18 și 22 de aici, sau o secvență substanțial similară cu aceasta având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență ; și un domeniu CDR3 al lanțului ușor (LCDR3) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde o pereche de secvență de aminoacizi HCDR3/LCDR3 așa cum este prezentat în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinde un domeniu CDR1 cu lanț greu (HCDR1) având un aminoacid așa cum este prezentat în tabelele 16, 18, , și 22 de aici, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență; un domeniu CDR2 cu lanț greu (HCDR2) având un aminoacid așa cum este prezentat în tabelele 16, 18 și 22, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitatea secvenței; un domeniu CDR3 cu lanț greu (HCDR3) având un aminoacid așa cum este prezentat în tabelele 16, 18 și 22, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitatea secvenței; un domeniu CDR1 al lanțului ușor (LCDR1) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau identitate de secvență de cel puțin 99%; un domeniu CDR2 al lanțului ușor (LCDR2) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau identitate de secvență de cel puțin 99% și un domeniu CDR3 al lanțului ușor (LCDR3) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelele 1, 16, 19 și 23 de aici, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Anumite molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 exemplificative, nelimitative din dezvăluire includ un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinzând domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, având secvențe de aminoacizi așa cum sunt prezentate în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici.

În anumite cazuri primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelul 16, Tabelul 18 sau Tabelul 22 și regiuni de determinare a complementarității lanțului ușor (LCDR1, LCDR2 și LCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelul 1, Tabelul 16, Tabelul 19 sau Tabelul 23.

În unele cazuri primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1730, 1762, 1778, 1786 și 1866 și regiuni de determinare a complementarității lanțului ușor (LCDR1, LCDR2 și LCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO: 26.

În unele cazuri primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității lanțului grele. (A1-HCDR1, A1-HCDR2 și A1-HCDR3) și trei regiuni de determinare a complementarității lanțului ușor (A1-LCDR1, A1-LCDR2 și A1-LCDR3), în care A1-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grup constând din SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 și 1868; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 și 1870; A1-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 și 1872; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:28; A1-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:30; și A1-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:32.

În unele cazuri primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde CDR-urile cu lanț greu și ușor ale unei perechi de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR selectate din grupul constând din: SEQ ID NO: 1730/26, 1762/26, 1778/26, 1786/26 și 1866/26

În unele cazuri primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde trei regiuni care determină complementaritatea lanțului greu (A1-HCDR1, A1-HCDR2 și A1-HCDR3) și trei lanțuri ușoare, regiuni de determinare a complementarității (A1-LCDR1, A1-LCDR2 și A1-LCDR3) și în care al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (A2-HCDR1, A2-HCDR2 și A2-HCDR3) și trei regiuni care determină complementaritatea lanțului ușor (A2-LCDR1, A2-LCDR2 și A2-LCDR3); în care A1-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 și 1868; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 și 1870; A1-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 și 1872; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:28; A1-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:30; și A1-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:32; și în care A2-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:20; A2-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:22; A2-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:24; A2-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:28; A2-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:30; și A2-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:32.

Anumite molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16, nelimitative, exemplificative ale dezvăluirii includ un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinzând un lanț greu cuprinzând regiuni cadru de domeniu variabil având o secvență de aminoacizi selectată dintre FR1 (SEQ ID NO: 1903), FR2 (SEQ ID NO: 1904), FR3 (SEQ ID NO: 1905) și FR4 (SEQ ID NO: 1906).

În mai multe cazuri, moleculele exemplificative de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 ale invenției includ o moleculă bispecifică de legare la antigen în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde un HCVR care cuprinde HCDR1-HCDR2-HCDR3 având secvențe de aminoacizi ale SEQ ID NO: 1907-1908-1909.

În unele cazuri, al doilea domeniu de legare a antigenului care se leagă în mod specific MUC16 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 18 sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95 %, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele cazuri, al doilea domeniu de legare a antigenului care se leagă în mod specific MUC16 cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) având secvența de aminoacizi a SECV ID Nr.:26 sau

o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95 %, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele cazuri, al doilea domeniu de legare la antigen care se leagă în mod specific MUC16 cuprinde un HCVR și LCVR (HCVR/LCVR) pereche de secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:18/26.

Anticorpul bispecific sau fragmentul acestuia de legare la antigen din dezvoltare poate avea următoarele proprietăți: leagă celulele umane care exprimă CD3 uman și celulele de maimuță cynomolgus care exprimă CD3 cynomolgus; leagă celule umane care exprimă MUC16 uman; inhibă creșterea tumorii la șoarecii imunocompromiși care poartă cancer ovarian uman xenogrefe; suprimă creșterea tumorii a tumorilor stabilite la șoarecii imunocompromiși care poartă cancer ovarian uman xenogrefe; primul domeniu de legare a antigenului leagă în mod specific o celulă efectoră cu o valoare EC_{50} mai mare de aproximativ 4 nM și, și al doilea domeniu de legare la antigen leagă în mod specific o celulă tumorală ovariană umană țintă cu un EC_{50} valoare mai mică de 3 nM, în care o astfel de valoare de legare EC_{50} este măsurată într-un test de legare FACS in vitro; al doilea domeniu de legare la antigen leagă în mod specific celula tumorală ovariană țintă cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 2 nM; primul domeniu de legare la antigen leagă în mod specific fiecare dintre CD3 uman și CD3 cynomolgus cu o valoare EC_{50} mai mare de aproximativ 40 nM, mai mare de aproximativ 100 nM, mai mare de aproximativ 200 nM, mai mare de aproximativ 300 nM, mai mare de aproximativ 400 nM, mai mare de aproximativ 500 nM, sau mai mare de aproximativ 1 μ M; primul domeniu de legare la antigen leagă în mod specific fiecare dintre CD3 uman și CD3 de cynomolgus cu legare sau afinitate de legare slabă sau fără măsurare; induce uciderea celulelor tumorale mediată de celule T cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 31 pM, măsurată într-un test in vitro de ucidere a celulelor tumorale mediate de celule T, de exemplu, în care celulele tumorale sunt celule OVCAR3; primul domeniu de legare la antigen leagă CD3 uman cu o valoare K_D mai mare de aproximativ 11 nM, măsurată într-un test in vitro de legare a rezonanței plasmonilor de suprafață; primul domeniu de legare la antigen leagă fiecare dintre CD3 uman și CD3 cynomolgus cu o valoare K_D mai mare de aproximativ 15 nM, mai mare de aproximativ 30 nM, mai mare de aproximativ 60 nM, mai mare de aproximativ 120 nM, mai mare de aproximativ 300 nM, sau mai mare de aproximativ 500 nM măsurată într-un test in vitro de legare a rezonanței plasmonilor de suprafață.

În anumite cazuri, anticorpii anti-CD3 conform invenției, fragmentele de legare la antigen și anticorpii bispecifici ai acestora au fost obținuți prin înlocuirea reziduurilor de aminoacizi ale unui parental într-o manieră treptată, pe baza diferențelor dintre secvența liniei germinale și secvența anticorpului parental.

În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la CD3 uman cu o proteină de referință care leagă antigenul cuprinzând trei regiuni care determină complementaritatea lanțului greu (A1-HCDR1, A1-HCDR2 și A1-HCDR3) și trei regiuni care determină complementaritatea lanțului ușor (A1-LCDR1, A1-LCDR2 și A1-LCDR3), A1-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1732, 1764, 1780, 1788 , și 1868; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1734, 1766, 1782, 1790 și 1870; A1-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1736, 1768, 1784, 1792 și 1872; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi SEQ ID NO: 28; A1-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO: 30; și A1-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. În unele cazuri primul domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la CD3 uman cu o proteină de referință de legare a antigenului care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre grupul constând din SEQ ID NO: 1730, 1762, 1778, 1786 și 1866 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi a SEQ ID NO:26.

Într-un aspect, dezvoltarea furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde o moleculă de legare a antigenului bispecific anti-MUC16/anti-CD3 și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic. Dezvoltarea furnizează în plus molecula bispecifică de legare la antigen anti-MUC16/anti-CD3, sau fragmentul acesteia de legare la antigen, din dezvoltare pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, metoda cuprinzând administrarea la subiect a compoziției farmaceutice cuprinzând o moleculă de legare a antigenului anti-MUC16 sau o moleculă de legare a antigenului bispecific anti-MUC16/anti-CD3 și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic. În unele cazuri, cancerul este selectat din grupul constând din cancere incluzând cancer ovarian, cancer de sân, cancer pancreatic, cancer pulmonar fără celule mici, colangiocarcinom intrahepatic cu formare de masă, adenocarcinom al colului uterin și adenocarcinom gastric. tract. În unele cazuri, cancerul este cancer ovarian. Cu toate acestea, metodele de tratament nu fac parte din invenția revendicată.

Prezenta dezvoltare furnizează molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele HCVR, LCVR sau CDR ale moleculelor bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 descrise

aici, Sunt dezvăluite molecule de acid nucleic cuprinzând secvențele de polinucleotide așa cum este prezentat în Tabelele 2, 17, 20, 21, 23 și 25 de aici, precum și molecule de acid nucleic care cuprind două sau mai multe dintre secvențele de polinucleotide așa cum sunt prezentate în tabelele 2, 17, 20, 21, 23 și 25 în orice combinație funcțională sau amenajarea acestuia. Vectorii de expresie recombinanți care poartă

5 acizii nucleici conform invenției și celulele gazdă în care au fost introduși astfel de vectori sunt, de asemenea, cuprinși de invenție, la fel ca și metodele de producere a anticorpilor prin cultivarea celulelor gazdă în condiții care permit producerea anticorpilor și recuperarea anticorpilor produși. Cu toate acestea, acizii nucleici, vectorii, celulele gazdă și metodele de producere a anticorpilor nu fac parte din invenția revendicată.

10 Prezenta dezvăluire include molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 având un model de glicozilare modificat. În unele aplicații, modificarea pentru a îndepărta situsurile de glicozilare nedorite poate fi utilă sau un anticorp lipsit de o porțiune fucoză prezentă pe lanțul de oligozaharide, de exemplu, pentru a crește funcția de citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (ADCC) (vezi Shield și colab. (2002) JBC 277:26733). În alte aplicații, se poate face modificarea

15 galactozilării pentru a modifica citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde o moleculă bispecifică de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 așa cum este dezvăluită aici și un purtător acceptabil farmaceutic. De asemenea, aici este descrisă compoziție care este o combinație între o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 și un al doilea agent terapeutic. De

20 exemplu, al doilea agent terapeutic poate fi orice agent care este combinat în mod avantajos cu o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16. Exemple de agenți care pot fi combinați în mod avantajos cu o moleculă bispecifică de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 sunt discutați în detaliu în altă parte aici.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează anticorpul bispecific sau fragmentul acestuia de legare

25 la antigen al dezvăluirii pentru utilizare în metode terapeutice pentru țintirea/uciderea celulelor tumorale care exprimă MUC16 folosind o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 conform invenției, în care metodele terapeutice cuprind administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-o compoziție farmaceutică, cuprinzând o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 conform invenției la un subiect care are nevoie de aceasta.

30 Metode pentru utilizarea anticorpilor invenției sunt descriși aici, incluzând o metodă de detectare a MUC16 într-o probă biologică, cuprinzând: obținerea unei probe biologice de la un subiect și detectarea dacă MUC16 este prezent în proba biologică prin contactarea probei biologice cu un anticorp anti-MUC16 sau fragment de legare la antigen al acestuia și detectarea legării dintre MUC16 și anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul de legare la antigen. În unele cazuri, proba biologică este o probă de țesut

35 sau de lichid selectată dintre plasmă, ser, ascită, ovar, uter, col uterin, ficat, vezică urinară, pancreas, stomac, intestin subțire sau gros, vezică biliară, sân, plămân, rinichi, salivare și glandele lacrimale sau orice malignitate epiteloidă a acestora.

De asemenea este descrisă o metodă de detectare a MUC16 la un pacient, cuprinzând: obținerea unei probe de țesut de la pacient; și detectarea dacă MUC16 este prezent în proba de țesut prin

40 contactarea probei de țesut cu un anticorp anti-MUC16 și detectarea legării dintre MUC16 și anticorpul anti-MUC16. În unele cazuri, metoda mai cuprinde diagnosticarea pacientului cu cancer atunci când este detectată prezența MUC16 în proba de țesut. Într-un caz, proba de țesut este țesut ovarian. Totuși, numai anticorpii definiți în revendicări intră în domeniul de aplicare al invenției.

De asemenea este descrisă o metodă de detectare a MUC16 la un pacient, cuprinzând: obținerea unei probe de plasmă de la pacient; și detectarea dacă MUC16 este prezent în proba de plasmă prin

45 contactarea probei de plasmă cu un anticorp anti-MUC16 și detectarea legării dintre MUC16 și anticorp anti-MUC16. În unele cazuri, metoda mai cuprinde diagnosticarea pacientului cu cancer atunci când este detectată prezența MUC16 în proba de plasmă. În unele cazuri, metoda mai cuprinde administrarea unei cantități eficiente de anticorp bispecific anti-CD3xMUC16 la pacientul diagnosticat. În unele cazuri,

50 metoda mai cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un ADC care cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen și un agent citotoxic la pacientul diagnosticat. Totuși, numai anticorpii definiți în revendicări intră în domeniul de aplicare al invenției.

Alte cazuri vor deveni evidente dintr-o revizuire a descrierii detaliate care urmează. Invenția este definită în revendicările independente. Alte aspecte și cazuri preferate sunt definite în revendicările

55 dependente. Orice aspecte, cazuri și exemple ale prezentei dezvăluiri care nu intră în scopul revendicărilor anexate nu fac parte din invenție și sunt furnizate doar în scopuri ilustrative.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figurile 1, 2 și 3 ilustrează profilurile farmacocinetice ale anticorpilor bispecfici anti-MUC16 x CD3 la șoareci de tip sălbatic (Fig. 1), șoareci CD3 umanizați (Fig. 2) sau șoareci MUC16 x CD3 umanizați (Fig.3).

Figura 4 prezintă rezultatele studiului model OVCAR-3 1 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr] în ziua 6). Toate grupurile au avut o sarcină tumorală similară cu cea evaluată de BLI înainte de începerea dozării. Datele prezentate sunt sarcina tumorală, așa cum a fost evaluată de BLI în ziua 6 după implantarea tumorii. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Nu a existat nicio diferență semnificativă în sarcina tumorală între grupuri.

Figura 5 prezintă rezultatele studiului model OVCAR-3 1 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr] în ziua 20). BSMUC16/CD3-001 reduce semnificativ sarcina tumorală la 0,1 și 0,5 mg/kg. Șoarecii NSG greșați cu celule T umane au fost implantați cu celule OVCAR-3/Luc umane. Tratamentul a început la 6 zile după implantarea tumorii. Șoarecii au fost tratați în Zilele 6, 10, 13, 16 și 21 cu 0,01, 0,1 sau 0,5 mg/kg BSMUC16/CD3-001 administrat IP sau tratați cu un control de legare la CD3 sau un control fără legare (0,5 mg/kg IP). Datele prezentate sunt sarcina tumorală, așa cum a fost evaluată de BLI în ziua 20 după implantarea tumorii. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Tratamentul cu BSMUC16/CD3-001 a fost comparat cu controlul fără legare (** p < 0,01 pentru 0,5 mg/kg, # p < 0,05 pentru 0,1 mg/kg BSMUC16/CD3-001).

Figura 6 prezintă rezultatele studiului model OVCAR-3 1 (Schimbarea plierii în tumorile evidente BLI între D6 și D20). BSMUC16/CD3-001 reduce semnificativ modificarea orificiului în sarcina tumorii la 0,01, 0,1 și 0,5 mg/kg. Șoarecii NSG greșați cu celule T umane au fost implantați cu celule OVCAR-3/Luc umane. Șoarecii au fost tratați în Zilele 6, 10, 13, 16 și 21 cu 0,01, 0,1 sau 0,5 mg/kg BSMUC16/CD3-001 administrat IP sau tratați cu un control care leagă CD3 sau un control fără legare (0,5 mg/kg IP). Datele prezentate sunt modificarea orificiilor în sarcina tumorală de la prima măsurare (luată înainte de începerea tratamentului) și în ziua 20 la sfârșitul studiului. Semnificația statistică a fost determinată folosind teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Tratamentul cu BSMUC16/CD3-001 a fost comparat cu controlul nelegator (** p < 0,01 pentru 0,5 mg/kg, # p < 0,05 pentru 0,1 mg/kg, \$ p < 0,05 pentru 0,01 mg/kg BSMUC16/CD3-001).

Figura 7 prezintă rezultatele studiului 2 al modelului OVCAR-3 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr] în ziua 4). Toate grupurile au avut o sarcină tumorală similară cu cea evaluată de BLI înainte de începerea dozării. Datele prezentate sunt sarcina tumorală, așa cum a fost evaluată de BLI în ziua 4 după implantarea tumorii. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Nu a existat nicio diferență semnificativă în sarcina tumorii în ziua 4 între grupuri.

Figura 8 prezintă rezultatele studiului model OVCAR-3 2 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr] în ziua 25). BSMUC16/CD3-005 reduce semnificativ sarcina tumorală la 0,5, 1 și 5 mg/kg. Șoarecii NSG greșați cu celule T umane au fost implantați cu celule OVCAR-3/Luc umane. Tratamentul a început la 5 zile după implantarea tumorii. Șoarecii au fost tratați în zilele 5, 8, 12, 15, 19 și 22 cu 0,1, 0,5, 1 sau 5 mg/kg REGN4019 administrat IV sau un control care se leagă de CD3 sau un control fără legare (5 mg/kg IV). Datele prezentate sunt sarcina tumorală, așa cum a fost evaluată de BLI în ziua 25 după implantarea tumorii. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney nepereche. Tratamentul cu BSMUC16/CD3-005 a fost comparat cu controlul nelegator (** p < 0,01 pentru 5 mg/kg, ## p < 0,01 pentru 1 mg/kg, \$\$ p < 0,01 pentru 0,5 mg/kg BSMUC16/CD3-005).

Figura 9 prezintă rezultatele studiului model OVCAR-3 2 (Schimbarea plierii în tumorile evidente BLI între D4 și D25). BSMUC16/CD3-005 reduce semnificativ creșterea tumorii la 0,5, 1 și 5 mg/kg. Șoarecii NSG greșați cu celule T umane au fost implantați cu celule OVCAR-3/Luc umane. Șoarecii au fost tratați în zilele 5, 8, 12, 15, 19 și 22 cu 0,1, 0,5, 1 sau 5 mg/kg REGN4019 administrat IV sau tratați cu un control care se leagă de CD3 sau cu un control fără legare (5 mg/kg IV). Datele prezentate sunt modificarea ori mai mare a sarcinii tumorale de la prima măsurare (luată cu o zi înainte de începerea tratamentului) și în ziua 25, la sfârșitul studiului. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Tratamentul cu BSMUC16/CD3-005 a fost comparat cu controlul nelegator (** p < 0,01 pentru 5 mg/kg, ## p < 0,01 pentru 1 mg/kg, \$\$ p < 0,01 pentru 0,5 mg/kg REGN4019).

Figura 10 prezintă rezultatele modelului ID8-VEGF/huMUC16. Dimensiunea tumorii în ziua 47 după implantare BSMUC16/CD3-001 reduce semnificativ creșterea tumorii într-un model singeneic atunci când tratamentul începe fie în ziua implantării, fie la 10 zile după implantarea tumorii. Șoarecii care exprimă CD3 uman în loc de CD3 de șoarece și o moleculă MUC16 himerică au fost implantați cu linia tumorală ovariană murină care exprimă o porțiune de MUC16 umană. S-au administrat șoareci BSMUC16/CD3-001 (100 ug I P) în ziua implantării sau la 10 zile după implantare sau control administrat de legare la CD3 (100 ug I P) în ziua implantării. Șoarecii au fost tratați în zilele 0, 4, 7, 10,

13, 17, 20 sau 24 pentru grupurile cu tratament imediat și în zilele 10, 13, 17, 20 și 24 pentru grupul în care doza a început în D10. Datele prezentate sunt volumul tumorii în ziua 47 după implantare. Semnificația statistică a fost determinată utilizând teste t Mann-Whitney neparametrice nepereche. Tratamentul cu BSMUC16/CD3-001 a fost comparat cu controlul de legare la CD3 (** p < 0,01 începând cu DO, * p < 0,05 începând cu D10).

Figurile 11A-11C ilustrează rezultatele analizei citometrice în flux (sau FACS) a legării anticorpilor bispecfici selecți la PEO-1, OVCAR3-Luc, celulele Jurkat și celulele T cynomolgus. Analiza de titrare a fost efectuată prin testarea unei game de diluții în serie ale fiecărui anticorp: fie Anticorpi bispecfici MUC16xCD3 BSM UC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-002 sau BSMUC16/CD3-003 sau un prim sau al doilea anticorp de control izotip (care nu are reactivitate încrucișată cu CD3 sau MUC16).

Figurile 12A și 12B prezintă exemple de PEO-1 (Fig. 12A) sau OVCAR3-Luc (Fig. 12B) distrugerea celulelor într-un test de citotoxicitate de 48 de ore după tratamentul anti-MUC16xanti-CD3 în prezența PBMC-urilor umane.

DESCRIERE DETALIATA

Informațiile tehnice prezentate mai jos pot, în anumite privințe, să depășească dezvăluirea dezvăluirii, care este definită exclusiv de revendicările anexate. Informațiile tehnice suplimentare sunt furnizate pentru a plasa dezvăluirea reală într-un context tehnic mai larg și pentru a ilustra posibilele evoluții tehnice conexe. Astfel de informații tehnice suplimentare care nu intră în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate nu fac parte din dezvăluire.

Înainte ca prezenta invenție să fie descrisă, trebuie să se înțeleagă că această invenție nu este limitată la anumite metode și condiții experimentale descrise, deoarece astfel de metode și condiții pot varia. De asemenea, trebuie înțeles că terminologia utilizată aici are doar scopul de a descrie cazuri particulare și nu se intenționează să fie limitativă, deoarece scopul prezentei invenții va fi limitat doar de revendicările anexate.

Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție. Așa cum este utilizat aici, termenul "aproximativ", atunci când este utilizat cu referire la o anumită valoare numerică citată, înseamnă că valoarea poate varia de la valoarea indicată cu nu mai mult de 1 %. De exemplu, așa cum este utilizată aici, expresia „aproximativ 100” include 99 și 101 și toate valorile dintre acestea (de exemplu, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 etc.).

Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica sau testarea prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt acum descrise.

Definiții

Expresia "CD3", așa cum este utilizată aici, se referă la un antigen care este exprimat pe celulele T ca parte a receptorului de celule T multimolecular (TCR) și care constă dintr-un homodimer sau heterodimer format din asocierea a două dintre cele patru lanțuri de receptor: CD3-epsilon, CD3-delta, CD3-zeta și CD3-gamma. CD3-epsilon uman cuprinde secvența de aminoacizi așa cum este prezentată în SEQ ID NO: 1897; CD3-delta umană cuprinde secvența de aminoacizi așa cum este prezentată în SEQ ID NO: 1898. Toate referințele la proteine, polipeptide și fragmente de proteine de aici sunt destinate să se refere la versiunea umană a respectivei proteine, polipeptide sau fragmente proteice, dacă nu se specifică în mod explicit ca fiind dintr-o specie non-umană. Astfel, expresia "CD3" înseamnă CD3 uman, dacă nu este specificat ca fiind dintr-o specie non-umană, de exemplu, "CD3 de șoarece", "CD3 de maimuță" etc.

Așa cum este utilizat aici, „un anticorp care leagă CD3” sau un „anticorp anti-CD3” include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care recunosc în mod specific o singură subunitate CD3 (de exemplu, epsilon, delta, gamma sau zeta), precum și anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care recunosc în mod specific un complex dimeric din două subunități CD3 (de exemplu, dimeri CD3 gamma/epsilon, delta/epsilon și zeta/zeta). Anticorpii și fragmentele de legare la antigen pot lega CD3 solubil și/sau CD3 exprimat la suprafața celulară. CD3 solubil include proteine CD3 naturale, precum și variante de proteine CD3 recombinante, cum ar fi, de exemplu, construcții CD3 monomerice și dimerice, cărora le lipsește un domeniu transmembranar sau sunt altfel neasociate cu o membrană celulară.

Așa cum este utilizată aici, expresia „CD3 exprimat la suprafața celulei” înseamnă una sau mai multe proteine CD3 care este/sunt exprimate pe suprafața unei celule in vitro sau in vivo, astfel încât cel puțin o parte a unei proteine CD3 este expus la partea extracelulară a membranei celulare și este accesibil unei porțiuni de legare a antigenului a unui anticorp. „CD3 exprimat pe suprafața celulei” include proteine CD3 conținute în contextul unui receptor funcțional al celulei T în membrana unei celule. Expresia „CD3 exprimat la suprafața celulei” include proteina CD3 exprimată ca parte a unui homodimer sau heterodimer pe suprafața unei celule (de exemplu, dimeri CD3 gamma/epsilon, delta/epsilon și zeta/zeta). Expresia „CD3 exprimat la suprafața celulei” include, de asemenea, un lanț CD3 (de exemplu,

CD3-epsilon, CD3-delta sau CD3-gamma) care este exprimat singur, fără alte tipuri de lanț CD3, pe suprafața unei celule. Un „CD3 exprimat la suprafața celulei” poate cuprinde sau consta dintr-o proteină CD3 exprimată pe suprafața unei celule care exprimă în mod normal proteina CD3. Alternativ, "CD3 exprimat la suprafața celulei" poate cuprinde sau consta din proteina CD3 exprimată pe suprafața unei celule care în mod normal nu exprimă CD3 uman pe suprafața sa, dar a fost concepută artificial pentru a exprima CD3 pe suprafața sa.

Expresia "MUC16", așa cum este utilizată aici, se referă la mucină 16. MUC16 este o glicoproteină membranară integrală cu un singur domeniu transmembranar foarte glicozilat, care este foarte exprimată în cancerul ovarian. Secvența de aminoacizi a MUC16 uman este prezentată în SEQ ID NO:1899.

Așa cum este utilizat aici, "un anticorp care leagă MUC16" sau un "anticorp anti-MUC16" include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care recunosc în mod specific MUC16.

Termenul "moleculă de legare la antigen" include anticorpi și fragmente de anticorpi de legare la antigen, incluzând, de exemplu, anticorpi bispecifici.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, înseamnă orice moleculă de legare la antigen sau complex molecular care cuprinde cel puțin o regiune de determinare a complementarității (CDR) care se leagă în mod specific la sau interacționează cu un anumit antigen (de exemplu, MUC16 sau CD3). Termenul "anticorp" include molecule de imunoglobulină cuprinzând patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfurice, precum și multimeri ai acestora (de exemplu, IgM). Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici ca HCVR sau V_H) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde trei domenii, C_{H1} , C_{H2} și C_{H3} . Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici ca LCVR sau V_L) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu (C_{L1}). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni de determinanțe a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri, aranjate de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. În diferite cazuri, FR-urile anticorpului anti-MUC16 sau anticorpului anti-CD3 (sau porțiunea de legare a antigenului) pot fi identice cu secvențele liniei germinale umane sau pot fi modificate în mod natural sau artificial. O secvență consens de aminoacizi poate fi definită pe baza unei analize alăturate a două sau mai multe CDR-uri.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, include de asemenea fragmente de legare la antigen ale moleculelor de anticorp complet. Termenii „porțiune de legare la antigen” a unui anticorp, „fragment de legare la antigen” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la o polipeptidă naturală, obținută enzimatic, sintetică sau modificată genetic antigenul pentru a forma un complex. Fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp pot fi derivate, de exemplu, din molecule de anticorp complet folosind orice tehnici standard adecvate, cum ar fi digestia proteolitică sau tehnici de inginerie genetică recombinată care implică manipularea și exprimarea ADN-ului care codifică domenii variabile și opțional constante ale anticorpului. Un astfel de ADN este cunoscut și/sau este ușor disponibil din, de exemplu, surse comerciale, biblioteci de ADN (inclusiv, de exemplu, biblioteci de anticorpi fagi) sau poate fi sintetizat. ADN-ul poate fi secvențiat și manipulat chimic sau prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, de exemplu, pentru a aranja unul sau mai multe domenii variabile și/sau constante într-o configurație adecvată sau pentru a introduce codoni, a crea resturi de cisteină, a modifica, adăuga sau șterge aminoacizi, etc.

Exemple nelimitative de fragmente de legare la antigen includ: (i) fragmente Fab; (ii) fragmente $F(ab')_2$; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu catenă unică; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere constând din resturile de aminoacizi care imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp (de exemplu, o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) cum ar fi o peptidă CDR3) sau o peptidă FR3-CDR3-FR4 constrânsă. Alte molecule modificate, cum ar fi anticorpi specifici unui domeniu, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi cu deleții de domeniu, anticorpi himerici, anticorpi grefați cu CDR, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi, nanocorpi (de exemplu, nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți etc.), mici imunofarmaceutice modulare (SMIP) și domenii variabile IgNAR de rechin, sunt de asemenea cuprinse în expresia "fragment de legare la antigen", așa cum este utilizat aici.

Un fragment de legare la antigen al unui anticorp va cuprinde de obicei cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR care este adiacent sau în cadru cu una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele de legare la antigen care au un domeniu V_H asociat cu un domeniu V_L , domeniile V_H

și V_L pot fi situate unul față de celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și conține dimeri V_H - V_H , V_H - V_L sau V_L - V_L . Alternativ, fragmentul de legare la antigen al unui anticorp poate conține un domeniu V_H sau V_L monomeric.

În anumite cazuri, un fragment de legare la antigen al unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent la cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificative, nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment de legare la antigen al unui anticorp din prezenta invenție includ: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; și (xiv) V_L - C_L . În orice configurație de domenii variabile și constante, incluzând oricare dintre configurațiile exemplificative enumerate mai sus, domeniile variabile și constante pot fi fie legate direct între ele, fie pot fi legate printr-o balama sau o regiune de legătură completă sau parțială. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 (de exemplu, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între domenii variabile și/sau constante adiacente într-o singură polipeptidă moleculă. Mai mult, un fragment de legare la antigen al unui anticorp poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) al oricăreia dintre configurațiile de domenii variabile și constante enumerate mai sus în asociere necovalentă unul cu celălalt și/ sau cu unul sau mai multe domenii V_H sau V_L monomerice {de exemplu, prin legătură(e) disulfurică}.

Ca și în cazul moleculelor de anticorp complet, fragmentele de legare la antigen pot fi monospecifice sau multispecifice (de exemplu, bispecifice). Un fragment de legare la antigen multispecific al unui anticorp va cuprinde în mod tipic cel puțin două domenii variabile diferite, în care fiecare domeniu variabil este capabil să se lege în mod specific la un antigen separat sau la un epitop diferit de pe același antigen. Orice format de anticorp multispecific, inclusiv formatele de anticorp bispecific exemplificative dezvăluite aici, poate fi adaptat pentru utilizare în contextul unui fragment de legare la antigen al unui anticorp utilizând tehnici de rutină disponibile în domeniu.

Anticorpii pot funcționa prin citotoxicitate dependentă de complement (CDC) sau citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi (ADCC). „Citotoxicitatea dependentă de complement” (CDC) se referă la liza celulelor care exprimă antigenul de către un anticorp în prezența complementului. „Citotoxicitatea mediată de celule dependentă de anticorpi” (ADCC) se referă la o reacție mediată de celule în care celulele citotoxice nespecifice care exprimă receptori Fc (FcRs) (de exemplu, celulele Natural Killer (NK), neutrofilele și macrofagele) recunosc anticorpul legat pe o celulă țintă și astfel conduc la liza celulei țintă. CDC și ADCC pot fi măsurate utilizând teste care sunt bine cunoscute și disponibile în domeniu. (A se vedea, de exemplu, brevetele SUA nr. 5.500.362 și 5.821.337 și Clynes și colab. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA) 95:652-656). Regiunea constantă a unui anticorp este importantă în capacitatea unui anticorp de a fixa complementul și de a media citotoxicitatea dependentă de celule. Astfel, izotipul unui anticorp poate fi selectat pe baza faptului dacă este de dorit ca anticorpul să medieze citotoxicitatea.

În anumite cazuri, anticorpii monospecfici anti-MUC16 sau anticorpii bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 sunt anticorpi umani. Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane. Anticorpii umani pot include resturi de aminoacizi necodificate de secvențe de imunoglobuline ale liniei germinale umane (de exemplu, mutații introduse prin mutagenезă aleatorie sau specifică locului in vitro sau prin mutație somatică in vivo), de exemplu în CDR-uri și în special CDR3. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă anticorpi în care secvențele CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost grefate pe secvențe cadru umane.

Anticorpii pot fi, în unele cazuri, anticorpi umani recombinanți. Termenul „anticorp uman recombinant”, așa cum este utilizat aici, este destinat să includă toți anticorpii umani care sunt preparați, exprimați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii exprimați folosind un vector de expresie recombinant transfectat într-o celulă gazdă (descriș mai jos).), anticorpi izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi umani recombinanți, combinatori (descriși mai jos), anticorpi izolați de la un animal (de exemplu, un șoarece) care este transgenic pentru genele imunoglobulinei umane (vezi de exemplu, Taylor și colab. (1992) Nucl. Acizi Res. 20:6287-6295) sau anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alte mijloace care implică despicarea secvențelor genei de imunoglobuline umane la alte secvențe ADN. Astfel de anticorpi umani recombinanți au regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobulină germinativă umană. În anumite cazuri, totuși, astfel de anticorpi umani recombinanți sunt supuși mutagenезei in vitro (sau, atunci când se utilizează un animal transgenic pentru secvențe Ig umane, mutagenезei somatice in vivo) și astfel secvențele de aminoacizi ale regiunilor V_H și V_L ale anticorpilor recombinanți sunt secvențe care, deși derivate din și legate de

secvențele V_H și V_L ale liniei germinale umane, pot să nu existe în mod natural în repertoriul liniei germinale de anticorpi umani in vivo.

Anticorpul uman pot exista în două forme care sunt asociate cu eterogenitatea balamalei. Într-o formă, o moleculă de imunoglobulină cuprinde o construcție stabilă cu patru lanțuri de aproximativ 150-160 kDa în care dimerii sunt ținuti împreună printr-o legătură disulfurică a lanțului greu intercatenar. Într-o a doua formă, dimerii nu sunt legați prin legături disulfurice inter-lanțuri și se formează o moleculă de aproximativ 75-80 kDa compusă dintr-un lanț ușor și greu cuplat covalent (jumătate de anticorp). Aceste forme au fost extrem de greu de separat, chiar și după purificarea prin afinitate.

Frecvența de apariție a celei de-a doua forme în diferite izotipuri IgG intacte se datorează, dar nu se limitează la, diferențelor structurale asociate cu izotipul regiunii balama a anticorpului. O singură substituție de aminoacid în regiunea balama a balamalei IgG4 umană poate reduce semnificativ aspectul celei de-a doua forme (Angal și colab. 1993) Molecular Immunology 30: 105) la niveluri observate în mod tipic utilizând o balama IgG1 umană. Prezenta invenție cuprinde anticorpi având una sau mai multe mutații în balama, regiunea CH2 sau CH3 care pot fi de dorit, de exemplu, în producție, pentru a îmbunătăți randamentul formei de anticorpi dorite.

Anticorpul pot fi anticorpi izolați. Un "anticorp izolat", așa cum este utilizat aici, înseamnă un anticorp care a fost identificat și separat și/sau recuperat din cel puțin o componentă a mediului său natural. De exemplu, un anticorp care a fost separat sau îndepărtat din cel puțin o componentă a unui organism, sau dintr-un țesut sau celulă în care anticorpul există în mod natural sau este produs în mod natural, este un "anticorp izolat" pentru scopurile prezentei dezvoltări. Un anticorp izolat include, de asemenea, un anticorp in situ într-o celulă recombinată. Anticorpul izolat sunt anticorpi care au fost supuși la cel puțin o etapă de purificare sau izolare. Conform anumitor cazuri, un anticorp izolat poate fi în mod substanțial lipsit de alte materiale celulare și/sau substanțe chimice.

De asemenea sunt descriși anticorpi cu un singur braț care leagă MUC16. Așa cum este utilizat aici, un "anticorp cu un singur braț" înseamnă o moleculă de legare la antigen care cuprinde un singur lanț greu de anticorp și un singur lanț ușor de anticorp. Anticorpul cu un singur braț pot cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR așa cum sunt prezentate în Tabelul 1.

Anticorpul anti-MUC16 sau anti-MUC16/anti-CD3 dezvoltat aici pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu cele corespunzătoare. secvențe germinale din care au fost derivați anticorpul. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvoltate aici cu secvențele liniei germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Prezenta dezvoltare include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi dezvoltate aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi din unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutați la restul reziduurile corespunzătoare din secvența de linie germinală din care a fost derivat anticorpul, sau la restul(ele) corespunzător(e) din altă secvență germinală umană, sau la o substituție conservatoare de aminoacizi a restului(lor) de linie germinativă (asemenea modificări de secvență sunt menționate aici în mod colectiv). ca „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente de legare la antigen care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite cazuri, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile V_H și/sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența germinativă originală din care a fost derivat anticorpul. În alte cazuri, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte cazuri, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate la restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinală diferită (adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența de linie germinală din care a fost anticorpul). derivate inițial). Mai mult, anticorpul prezentei invenții pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă. din secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, anticorpul și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate cu ușurință pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, legarea crescută (de exemplu, măsurată prin titrarea legăturii celulare sau legarea FACS) sau legarea. afinitate (de exemplu, K_D), proprietăți biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz), imunogenitate redusă etc. Anticorpul și fragmentele de legare la antigen obținute în acest mod general sunt cuprinse în prezenta dezvoltareC u toate acestea, doar

un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman, în care al doilea domeniu de legare la antigen cuprinde HCDR1-HCDR2-HCDR3- Domeniile LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32, așa cum sunt definite în revendicări, sunt în sfera anticorpilor din invenția revendicată.

De asemenea sunt descriși, anticorpi anti-MUC16 sau anti-MUC16/anti-CD3 cuprinzând variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, anticorpi anti-MUC16 sau anti-MUC16/anti-CD3 având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține, etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR prezentate în Tabelul 1 de aici sau așa cum este descris în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorp cunoscută ca paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, anticorpi diferiți se pot lega la diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Epitopii pot fi fie conformaționali, fie liniari. Un epitop conformațional este produs de aminoacizi juxtapuși spațial din diferite segmente ale lanțului polipeptidic linear. Un epitop liniar este unul produs de resturile de aminoacizi adiacente dintr-un lanț polipeptidic. În anumite circumstanțe, un epitop poate include fragmente de zaharide, grupări fosforil sau grupări sulfonil de pe antigen.

Termenul „identitate substanțială” sau „substanțial identic”, atunci când se referă la un acid nucleic sau fragment al acestuia, indică faptul că, atunci când este aliniat în mod optim cu inserții sau deleții adecvate de nucleotide cu un alt acid nucleic (sau catena sa complementară), există identitate de secvență de nucleotide. În cel puțin aproximativ 95% și mai preferabil cel puțin aproximativ 96%, 97%, 98% sau 99% din baze nucleotidice, măsurate prin orice algoritm binecunoscut de identitate de secvență, cum ar fi FASTA, BLAST sau Gap, ca discutat mai jos. O moleculă de acid nucleic având identitate substanțială cu o moleculă de acid nucleic de referință poate, în anumite cazuri, să codifice o polipeptidă având aceeași secvență de aminoacizi sau substanțial similară cu polipeptida codificată de molecula de acid nucleic de referință.

Așa cum se aplică polipeptidelor, termenul „asemănare substanțială” sau „substanțial asemănător” înseamnă că două secvențe de peptide, atunci când sunt aliniate optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT, folosind ponderi implicite ale intervalului, împărtășesc cel puțin 95% identitate de secvență, chiar mai preferabil, cel puțin 98% sau 99% identitate de secvență. De preferință, pozițiile reziduurilor care nu sunt identice diferă prin substituții conservatoare de aminoacizi. O „substituție conservatoare de aminoacid” este una în care un rest de aminoacid este substituit cu un alt rest de aminoacid având o catenă laterală (grupare R) cu proprietăți chimice similare (de exemplu, sarcină sau hidrofobicitate). În general, o substituție conservatoare a aminoacizilor nu va schimba substanțial proprietățile funcționale ale unei proteine. În cazurile în care două sau mai multe secvențe de aminoacizi diferă una de cealaltă prin substituții conservatoare, identitatea secvenței procentuale sau gradul de similaritate poate fi ajustat în sus pentru a corecta natura conservatoare a substituției. Mijloacele pentru realizarea acestei ajustări sunt binecunoscute specialiștilor în domeniu. Vezi, de exemplu, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331. Exemple de grupuri de aminoacizi care au catene laterale cu proprietăți chimice similare includ (1) catene laterale alifatic: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; (2) catene laterale alifatic-hidroxil: serină și treonină; (3) lanțuri laterale care conțin amidă: asparagină și glutamina; (4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; (5) lanțuri laterale de bază: lizină, arginină și histidină; (6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și (7) lanțuri laterale care conțin sulf sunt cisteină și metionină. Grupările de substituție a aminoacizilor conservatoare preferate sunt: valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamina. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea log-probabilității PAM250 dezvăluită în Gonnet și colab. (1992) Science 256: 1443-1445. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

Asemănarea secvenței pentru polipeptide, la care se face referire și ca identitate de secvență, este măsurată în mod obișnuit folosind software-ul de analiză a secvenței. Software-ul de analiză a proteinelor potrivește secvențe similare folosind măsuri de similitudine atribuite diferitelor substituții, deleții și alte modificări, inclusiv substituții conservatoare de aminoacizi. De exemplu, software-ul GCG conține programe precum Gap și Bestfit care pot fi utilizate cu parametrii implicați pentru a determina omologia secvenței sau identitatea secvenței între polipeptide strâns legate, cum ar fi polipeptide omoloage din

diferite specii de organisme sau între o proteină de tip sălbatic și o muteină a acesteia. . Vezi, de exemplu, GCG Versiunea 6.1. Secvențele de polipeptide pot fi, de asemenea, comparate folosind FASTA utilizând parametrii impliciti sau recomandați, un program din GCG Versiunea 6.1. FASTA (de exemplu, FASTA2 și FASTA3) furnizează aliniamente și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (Pearson (2000) supra). Un alt algoritm preferat atunci când se compară o secvență a invenției cu o bază de date care conține un număr mare de secvențe din diferite organisme este programul de calculator BLAST, în special BLASTP sau TBLASTN, folosind parametrii impliciti. Vezi, de exemplu, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Acizi nucleici Res. 25:3389-402.

Mutații ale liniei germinale

Anticorpul conform invenției sunt definiți prin revendicări. Alți anticorpi sunt, de asemenea, descriși aici. Anticorpul anti-CD3 dezbătut aici cuprind una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiuni CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu în comparație cu secvențele germinale corespunzătoare din care au fost derivați anticorpul.

Sunt descriși anticorpi și fragmente ale acestora care leagă antigenul, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi descrise aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi din unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutați la restul(ri) corespunzător(are) a secvenței de linie germinativă din care a fost derivat anticorpul, sau la restul(rile) corespunzător(are) al altei secvențe de linie germinală umană, sau la o substituție conservativă de aminoacizi a restului(or) corespunzător(are) de linie germinală (asemenea modificări de secvență sunt menționate aici colectiv ca „mutații ale liniei germinale”) și care au legare slabă sau deloc detectabilă la un antigen CD3. Câțiva astfel de anticorpi exemplari care recunosc CD3 sunt descriși în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici. Cu toate acestea, doar un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman, în care al doilea domeniu de legare la antigen cuprinde HCDR1-HCDR2-Domeniile HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32, așa cum sunt definite în revendicări, se încadrează în domeniul de aplicare al anticorpilor invenției revendicate.

Mai mult, anticorpul pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă. din secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, anticorpul și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, legare sau afinitate de legare slabă sau redusă, proprietăți farmacocinetice îmbunătățite sau îmbunătățite, imunogenitate redusă etc. .

De asemenea sunt descrși aici anticorpi anti-CD3 cuprinzând variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR dezbătute aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, anticorpi anti-CD3 având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține, etc. substituții conservatoare de aminoacizi relativ la oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR prezentate în Tabelele 16, 18, 19, 22 și 23 de aici. Anticorpul și moleculele bispecifice de legare a antigenului pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor, în comparație cu secvențele germinale corespunzătoare din care au fost derivate domeniile individuale de legare a antigenului, menținând sau îmbunătățind în același timp legarea dorită, slab sau deloc detectabilă, la antigenul CD3. O „substituție conservatoare de aminoacid” este una în care un rest de aminoacid este substituit cu un alt rest de aminoacid având o catenă laterală (grupare R) cu proprietăți chimice similare (de exemplu, sarcină sau hidrofobicitate). În general, o substituție conservatoare a aminoacizilor nu va schimba substanțial proprietățile funcționale ale unei proteine, adică substituția aminoacizilor menține sau îmbunătățește legarea sau afinitatea de legare slabă până la deloc detectabilă dorită în cazul moleculelor de legare anti-CD3. Exemple de grupuri de aminoacizi care au catene laterale cu proprietăți chimice similare includ (1) catene laterale alifatic: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; (2) catene laterale alifatic-hidroxil: serină și treonină; (3) lanțuri laterale care conțin amidă: asparagină și glutamina; (4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; (5) lanțuri laterale de bază: lizină, arginină și histidină; (6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și (7) lanțuri laterale care conțin sulf sunt cisteină și metionină. Grupările de substituție de aminoacizi conservatoare preferate sunt: valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamina. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea log-

probabilității PAM250 dezvoltată în Gonnet și colab. (1992) Science 256: 1443-1445. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

De asemenea sunt descrise aici molecule de legare a antigenului care cuprind un domeniu de legare a antigenului cu o secvență de aminoacizi HCVR și/sau CDR care este substanțial identică cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR și/sau CDR descrise aici, menținând sau îmbunătățind în același timp afinitate slabă pentru antigenul CD3. Termenul „identitate substanțială” sau „substanțial identic”, atunci când se referă la o secvență de aminoacizi, înseamnă că două secvențe de aminoacizi, atunci când sunt aliniate optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT, folosind ponderi implicite ale intervalului, împărtășesc o identitate de secvență de cel puțin 95%, chiar mai preferabil cel puțin 98% sau 99% identitate de secvență. De preferință, pozițiile resturilor care nu sunt identice diferă prin substituții conservatoare de aminoacizi. În cazurile în care două sau mai multe secvențe de aminoacizi diferă una de cealaltă prin substituții conservatoare, identitatea secvenței procentuale sau gradul de similaritate poate fi ajustat în sus pentru a corecta natura conservatoare a substituției. Mijloacele pentru realizarea acestei ajustări sunt binecunoscute specialiștilor în domeniu. Vezi, de exemplu, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331.

Asemănarea secvenței pentru polipeptide, la care se face referire și ca identitate de secvență, este măsurată în mod obișnuit folosind software-ul de analiză a secvenței. Software-ul de analiză a proteinelor potrivește secvențe similare folosind măsuri de similitudine atribuite diferitelor substituții, deleții și alte modificări, inclusiv substituții conservatoare de aminoacizi. De exemplu, software-ul GCG conține programe precum Gap și Bestfit care pot fi utilizate cu parametrii implicați pentru a determina omologia secvenței sau identitatea secvenței între polipeptide strâns legate, cum ar fi polipeptide omoloage din diferite specii de organisme sau între o proteină de tip sălbatic și o muteină a acesteia. Vezi, de exemplu, GCG Versiunea 6.1. Secvențele de polipeptide pot fi, de asemenea, comparate folosind FASTA utilizând parametrii implicați sau recomandați, un program din GCG Versiunea 6.1. FASTA (de exemplu, FASTA2 și FASTA3) furnizează aliniamente și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (Pearson (2000) supra). Un alt algoritm preferat atunci când se compară o secvență cu o bază de date care conține un număr mare de secvențe din diferite organisme este programul de calculator BLAST, în special BLASTP sau TBLASTN, folosind parametrii implicați. Vezi, de exemplu, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Acizi nucleici Res. 25:3389-402.

Odată obținute, domeniile de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale au fost testate pentru legare sau afinitate de legare scăzută utilizând una sau mai multe teste in vitro. Deși anticorpii care recunosc un anumit antigen sunt de obicei analizați pentru scopul lor prin testarea unei legături mari (adică puternice) sau a afinității de legare la antigen, anticorpii prezentei invenții prezintă legare slabă sau nicio legare detectabilă. Moleculele bispecifice de legare a antigenului care cuprind unul sau mai multe domenii de legare a antigenului obținute în acest mod general s-au dovedit a fi avantajoase ca terapii tumorale determinate de aviditate.

Beneficii neașteptate, de exemplu, proprietăți farmacocinetice îmbunătățite și toxicitate scăzută pentru pacient pot fi realizate din metodele descrise aici.

Proprietățile de legare ale anticorpilor

Așa cum este utilizat aici, termenul „legare” în contextul legării unui anticorp, imunoglobulina, fragmentul de legare a anticorpilor sau proteina care conține Fc la oricare, de exemplu, un antigen predeterminat, cum ar fi o proteina de suprafața celulară sau un fragment al acesteia, se referă de obicei la o interacțiune sau asociere între cel puțin două entități sau structuri moleculare, cum ar fi o interacțiune anticorp-antigen.

De exemplu, afinitatea de legare corespunde în mod obișnuit unei valori K_D de aproximativ 10^{-7} M sau mai puțin, cum ar fi aproximativ 10^{-8} M sau mai puțin, cum ar fi aproximativ 10^{-9} M sau mai puțin atunci când este determinată, de exemplu, de tehnologia rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) în un instrument BIAcore 3000 care utilizează antigenul ca ligand și anticorpul, Ig, fragmentul de legare a anticorpului sau proteina care conține Fc ca analit (sau antiligand). Strategiile de legare pe bază de celule, cum ar fi testele de legare de sortare a celulelor activate cu fluorescent (FACS), sunt de asemenea utilizate în mod obișnuit, iar datele FACS se corelează bine cu alte metode, cum ar fi legarea competiției radioligand și SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods, 1997, 201 (2): 223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

În consecință, anticorpul sau proteina de legare a antigenului se leagă la antigenul predeterminat sau la molecula de suprafață celulară (receptor) având o afinitate corespunzătoare unei valori K_D care este de cel puțin zece ori mai mică decât afinitatea sa pentru legarea la un antigen nespecific. (de exemplu, BSA, cazeină). Afinitatea unui anticorp care corespunde unei valori K_D care este egală cu sau mai mică

de zece ori mai mică decât un antigen nespecific poate fi considerată legare nedetectabilă, totuși un astfel de anticorp poate fi asociat cu un al doilea. brațul de legare a antigenului pentru producerea unui anticorp bispecific.

Termenul " K_D " (M) se referă la constanta de echilibru de disociere a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen sau constanta de echilibru de disociere a unui anticorp sau fragment de legare a anticorpului care se leagă la un antigen. Există o relație inversă între K_D și afinitatea de legare, prin urmare, cu cât valoarea K_D este mai mică, cu atât este mai mare, adică mai puternică, afinitatea. Astfel, termenii „afinitate mai mare” sau „afinitate mai puternică” se referă la o capacitate mai mare de a forma o interacțiune și, prin urmare, o valoare K_D mai mică și, invers, termenii „afinitate mai scăzută” sau „afinitate mai slabă” se referă la o capacitate mai mică de a forma o interacțiune. și, prin urmare, o valoare K_D mai mare. În anumite circumstanțe, o afinitate mai mare de legare (sau K_D) a unei anumite molecule (de exemplu, anticorp) la molecula sa parteneră interactivă (de exemplu, antigenul X) în comparație cu afinitatea de legare a moleculei (de exemplu, anticorpul) la o altă moleculă parteneră interactivă (de exemplu, antigenul). Y) poate fi exprimat ca un raport de legare determinat prin împărțirea valorii K_D mai mare (afinitate mai mică sau mai slabă) la K_D mai mică (afinitate mai mare sau mai puternică), de exemplu exprimată ca afinitate de legare de 5 ori sau de 10 ori mai mare, după caz.

Termenul " k_d " (sec⁻¹ sau 1/s) se referă la constanta vitezei de disociere a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen sau la constanta vitezei de disociere a unui anticorp sau fragment de legare a anticorpului. Valoarea menționată mai este denumită și valoarea k_{off} .

Termenul " k_a " (M⁻¹ x sec⁻¹ sau 1/M) se referă la constanta vitezei de asociere a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen sau la constanta vitezei de asociere a unui anticorp sau fragment de legare a anticorpului.

Termenul " K_A " (M⁻¹ sau 1/M) se referă la constanta de echilibru de asociere a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen sau la constanta de echilibru de asociere a unui anticorp sau fragment de legare la anticorp. Constanta de echilibru de asociere se obține prin împărțirea k_a prin k_d .

Termenul „EC50” sau „EC₅₀” se referă la jumătatea concentrației efective maxime, care include concentrația unui anticorp care induce un răspuns la jumătatea distanței dintre linia de bază și maximă după un timp de expunere specificat. EC₅₀ reprezintă în esență concentrația unui anticorp în care se observă 50% din efectul său maxim. În anumite cazuri, valoarea EC₅₀ este egală cu concentrația unui anticorp conform invenției care dă legarea semimaximală la celulele care exprimă CD3 sau antigenul asociat tumorii, așa cum este determinat de, de ex. un test de legare FACS. Astfel, se observă o legare redusă sau mai slabă cu o EC₅₀ crescută sau jumătate din valoarea concentrației efective maxime.

Într-o variantă de realizare, legare scăzută poate fi definită ca o concentrație crescută de anticorpi EC₅₀ care permite legarea la jumătatea cantității maxime de celule țintă.

Într-o altă variantă de realizare, valoarea EC₅₀ reprezintă concentrația unui anticorp conform invenției care determină epuizarea semimaximală a celulelor țintă prin activitatea citotoxică a celulelor T. Astfel, activitatea citotoxică crescută (de ex. uciderea celulelor tumorale mediată de celulele T) se observă cu o EC₅₀ scăzută sau la jumătate din valoarea concentrației efective maxime.

Molecule bispecifice de legare a antigenului

Anticorpii descriși aici pot fi monospecfici, bispecfici sau multispecfici. Anticorpii conform invenției sunt bispecfici, așa cum sunt definiți în revendicări. Anticorpii multispecfici pot fi specfici pentru diferiți epitopi ai unei polipeptide țintă sau pot conține domenii de legare la antigen specifice pentru mai mult de o polipeptidă țintă. Vezi, de exemplu, Tutt și colab., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Anticorpii monospecfici anti-MUC16 sau anticorpii bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 din prezenta invenție pot fi legați sau co-exprimați cu o altă moleculă funcțională, de exemplu, o altă peptidă sau proteină. De exemplu, un anticorp sau un fragment al acestuia poate fi legat funcțional (de exemplu, prin cuplare chimică, fuziune genetică, asociere necovalentă sau în alt mod) la una sau mai multe alte entități moleculare, cum ar fi un alt anticorp sau fragment de anticorp pentru a produce un bispecific sau un fragment de anticorp. anticorp multispecific cu o a doua sau suplimentară specificitate de legare.

Utilizarea expresiei "anticorp anti-CD3" sau "anticorp anti-MUC16" de aici este destinată să includă atât anticorpi monospecfici anti-CD3 sau anti-MUC16, cât și anticorpi bispecfici cuprinzând un braț de legare a CD3 și un braț de legare a MUC16. Astfel, prezenta invenție se referă anticorpi bispecfici în care un braț al unei imunoglobuline leagă CD3 uman, iar celălalt braț al imunoglobulinei este specific pentru MUC16 uman. Brațul de legare CD3 poate cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR, așa cum este prezentat în Tabelele 1, 16, 18, 19, 22 și 23 de aici.

În anumite cazuri, brațul care leagă CD3 se leagă de CD3 uman și induce activarea celulelor T umane. În anumite cazuri, brațul care leagă CD3 se leagă slab de CD3 uman și induce activarea celulelor T umane. În alte cazuri, brațul care leagă CD3 se leagă slab la CD3 uman și induce uciderea celulelor care

exprimă antigenul asociat tumorii în contextul unui anticorp bispecific sau multispecific. În alte cazuri, brațul care leagă CD3 se leagă sau se asociază slab cu CD3 uman și cynomolgus (maimuță), dar interacțiunea de legare nu este detectabilă prin testele in vitro cunoscute în domeniu. Brațul de legare a MUC16 poate cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR așa cum este prezentat în Tabelul 1 de aici.

Prezenta invenție se referă la anticorpi bispecifici și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 și MUC16, așa cum este definit în revendicări. Astfel de molecule pot fi denumite aici, de exemplu, "anti-CD3/anti-MUC16" sau "anti-CD3xMUC16" sau "CD3xMUC16" molecule bispecifice, sau altă terminologie similară (de exemplu, anti-MUC16/anti-CD3). Aici sunt descrise molecule bispecifice de legare a antigenului construite cu un prim braț de legare a antigenului care leagă MUC16 și un al doilea braț de legare a antigenului care leagă CD3. În unele cazuri, brațul anti-CD3 cuprinde un lanț greu derivat din IGHV3-9*01, IGHJ6*02, IGHD5-12*01. În altele cazuri, molecula bispecifică de legare a antigenului activează celulele PBMC umane și/sau induce activitate citotoxică pe liniile celulare care exprimă antigenul tumoral.

Termenul "MUC16", așa cum este utilizat aici, se referă la proteina MUC16 umană, cu excepția cazului în care este specificat ca fiind dintr-o specie non-umană (de exemplu, "șoarece MUC16", "maimuță MUC16" etc.). Proteina MUC16 umană are secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NO: 1899.

Moleculele bispecifice de legare la antigen menționate mai sus care leagă în mod specific CD3 și MUC16 pot cuprinde o moleculă de legare a antigenului anti-CD3 care se leagă la CD3 cu o afinitate de legare slabă, cum ar fi prezentând un K_D mai mare de aproximativ 40 nM, măsurat printr-o afinitate in vitro test de legare. Moleculele bispecifice de legare a antigenului menționate mai sus pot cuprinde o moleculă de legare a antigenului anti-CD3 care se leagă la CD3 și prezintă o EC_{50} mai mare de aproximativ 100 nM, măsurată printr-un test de titrare FACS. Moleculele bispecifice de legare a antigenului menționate mai sus pot cuprinde o moleculă de legare a antigenului anti-CD3 care nu prezintă nicio legare măsurabilă sau observabilă la CD3, măsurată printr-un test de legare a afinității in vitro sau un test de titrare FACS, dar păstrează capacitatea de a activa celulele PBMC umane. și/sau induce activitate citotoxică pe liniile celulare care exprimă antigenul tumoral.

Așa cum este utilizată aici, expresia „moleculă de legare la antigen” înseamnă o proteină, polipeptidă sau complex molecular care cuprinde sau constă din cel puțin o regiune determinantă a complementarității (CDR) care singură sau în combinație cu unul sau mai multe CDR și/sau regiuni cadru suplimentare. (FRs), se leagă în mod specific la un anumit antigen. În anumite variante de realizare, o moleculă de legare a antigenului este un anticorp sau un fragment al unui anticorp, așa cum acești termeni sunt definiți în altă parte aici.

Așa cum este utilizată aici, expresia "moleculă bispecifică de legare a antigenului" înseamnă o proteină, polipeptidă sau complex molecular care cuprinde cel puțin un prim domeniu de legare a antigenului și un al doilea domeniu de legare a antigenului. Fiecare domeniu de legare a antigenului din molecula bispecifică de legare a antigenului cuprinde cel puțin un CDR care singur, sau în combinație cu unul sau mai multe CDR-uri și/sau FR-uri suplimentare, se leagă în mod specific la un anumit antigen. În contextul prezentei invenții, primul domeniu de legare la antigen se leagă în mod specific la un prim antigen (de exemplu, CD3), iar al doilea domeniu de legare la antigen se leagă în mod specific la un al doilea antigen distinct (de exemplu, MUC16).

În prezenta invenție, molecula bispecifică de legare la antigen este un anticorp bispecific sau un fragment de legare la antigen al acestuia, așa cum este definit în revendicări. Fiecare domeniu de legare la antigen al unui anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (HCVR) și un domeniu variabil al lanțului ușor (LCVR). În contextul unei molecule bispecifice de legare la antigen care cuprinde un prim și un al doilea domeniu de legare la antigen (de exemplu, un anticorp bispecific), CDR-urile primului domeniu de legare la antigen pot fi desemnate cu prefixul „A1” și CDR-urile de al doilea domeniu de legare la antigen poate fi desemnat cu prefixul "A2". Astfel, CDR-urile primului domeniu de legare la antigen pot fi denumite aici A1-HCDR1, A1-HCDR2 și A1-HCDR3; și CDR-urile celui de-al doilea domeniu de legare la antigen pot fi denumite aici A2-HCDR1, A2-HCDR2 și A2-HCDR3.

Primul domeniu de legare a antigenului și al doilea domeniu de legare a antigenului pot fi conectate direct sau indirect unul la altul pentru a forma o moleculă bispecifică de legare a antigenului. Alternativ, primul domeniu de legare a antigenului și al doilea domeniu de legare a antigenului pot fi fiecare conectat la un domeniu de multimerizare separat. Asocierea unui domeniu de multimerizare cu un alt domeniu de multimerizare facilitează asocierea dintre cele două domenii de legare a antigenului, formând astfel o moleculă bispecifică de legare a antigenului. După cum este utilizat aici, un "domeniu de multimerizare" este orice macromoleculă, proteină, polipeptidă, peptidă sau aminoacid care are capacitatea de a se asocia cu un al doilea domeniu de multimerizare cu aceeași structură sau constituție

sau similară. De exemplu, un domeniu de multimerizare poate fi o polipeptidă cuprinzând un domeniu al imunoglobulinei C_{H3} . Un exemplu nelimitativ de componentă de multimerizare este o porțiune Fc a unei imunoglobuline (cuprinzând un domeniu $C_{H2}-C_{H3}$), de exemplu, un domeniu Fc al unei IgG selectate dintre izotipurile IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4, precum și orice alotip în cadrul fiecărui grup de izotip.

Moleculele bispecifice de legare a antigenului vor cuprinde în mod tipic două domenii de multimerizare, de exemplu, două domenii Fc care sunt fiecare parte individuală a unui lanț greu de anticorp separat. Primul și al doilea domeniu de multimerizare pot fi de același izotip IgG, cum ar fi, de exemplu, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Alternativ, primul și al doilea domeniu de multimerizare pot fi de izotipuri IgG diferite, cum ar fi, de exemplu, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 etc.

În anumite cazuri, domeniul de multimerizare este un fragment Fc sau o secvență de aminoacizi cu lungime de la 1 până la aproximativ 200 de aminoacizi care conține cel puțin un rest de cisteină. În alte cazuri, domeniul de multimerizare este un rest de cisteină sau o peptidă scurtă care conține cisteină. Alte domenii de multimerizare includ peptide sau polipeptide care cuprind sau constau dintr-un fermoar de leucină, un motiv cu buclă helix sau un motiv cu bobină încolăcită.

Orice format sau tehnologie de anticorp bispecific poate fi utilizat pentru a produce moleculele bispecifice de legare la antigen descrise aici. De exemplu, un anticorp sau fragment al acestuia având o primă specificitate de legare la antigen poate fi legat funcțional (de exemplu, prin cuplare chimică, fuziune genetică, asociere necovalentă sau altfel) la una sau mai multe alte entități moleculare, cum ar fi un alt anticorp sau fragment de anticorp având o a doua specificitate de legare a antigenului pentru a produce o moleculă bispecifică de legare a antigenului. Formatele bispecifice exemplificative specifice care pot fi utilizate includ, fără limitare, de exemplu, formate bispecifice bazate pe scFv sau diabody, fuziuni IgG-scFv, domeniu dublu variabil (DVD)-Ig, Quadroma, butoane-în- găuri, lanț ușor comun (de exemplu, lanț ușor comun cu butoane în găuri etc.), CrossMab, CrossFab, corp (SEED), fermoar cu leucină, Duobody, IgG1/IgG2, Fab cu dublă acțiune (DAF)-IgG și Formate specifice Mab2bi (a se vedea, de exemplu, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, și referințele citate aici, pentru o revizuire a formatelor de mai sus).

Domeniile de multimerizare, de exemplu, domeniile Fc, pot cuprinde una sau mai multe modificări de aminoacizi (de exemplu, inserții, deleții sau substituții) în comparație cu cele de tip sălbatic, care apar în mod natural. versiunea domeniului Fc. De exemplu, molecule bispecifice de legare a antigenului cuprinzând una sau mai multe modificări în domeniul Fc care are ca rezultat un domeniu Fc modificat având o interacțiune de legare modificată (de exemplu, îmbunătățită sau diminuată) între Fc și FcRn. De exemplu, molecula bispecifică de legare a antigenului cuprinde o modificare într-o regiune C_{H2} sau C_{H3} , în care modificarea crește afinitatea domeniului Fc pentru FcRn într-un mediu acid (de exemplu, într-un endozom în care pH-ul variază de la aproximativ 5,5 la aproximativ 6,0). Exemple nelimitative de astfel de modificări Fc includ, de exemplu, o modificare la poziția 250 (de exemplu, E sau Q); 250 și 428 (de exemplu, L sau F); 252 (de exemplu, L/Y/F/W sau T), 254 (de exemplu, S sau T) și 256 (de exemplu, S/R/Q/E/D sau T); sau o modificare la poziția 428 și/sau 433 (de exemplu, L/R/S/P/Q sau K) și/sau 434 (de exemplu, H/F sau Y); sau o modificare la poziția 250 și/sau 428; sau o modificare la poziția 307 sau 308 (de exemplu, 308F, V308F) și 434. De exemplu, modificarea cuprinde o modificare 428L (de exemplu, M428L) și 434S (de exemplu, N434S); o modificare 428L, 259I (de exemplu, V259I) și 308F (de exemplu, V308F); o modificare 433K (de exemplu, H433K) și o modificare 434 (de exemplu, 434Y); o modificare 252, 254 și 256 (de exemplu, 252Y, 254T și 256E); o modificare 250Q și 428L (de exemplu, T250Q și M428L); și o modificare 307 și/sau 308 (de exemplu, 308F sau 308P).

De asemenea aici sunt descrise molecule bispecifice de legare a antigenului cuprinzând un prim domeniu C_{H3} și un al doilea domeniu Ig C_{H3} , în care primul și al doilea domeniu Ig C_{H3} diferă unul de celălalt prin cel puțin un aminoacid și în care cel puțin o diferență de aminoacid reduce legarea anticorpului bispecific la proteina A în comparație cu un anticorp bispecific lipsit de diferența de aminoacizi. De exemplu, primul domeniu Ig C_{H3} se leagă la proteina A, iar al doilea domeniu Ig C_{H3} conține o mutație care reduce sau elimină legarea proteinei A, cum ar fi o modificare H95R (prin numerotarea exonului IMGT; H435R prin numerotarea EU). Al doilea C_{H3} poate cuprinde în plus o modificare Y96F (prin IMGT; Y436F de către EU). A se vedea, de exemplu, brevetul SUA nr. 8,586,713. Alte modificări care pot fi găsite în al doilea C_{H3} includ: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M și V82I (de IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M și V422I de EU) în cazul anticorpilor Ig1; N44S, K52N și V82I (IMGT; N384S, K392N și V422I de către UE) în cazul anticorpilor IgG2; și Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q și V82I (de IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q și V422I de UE) în cazul anticorpilor IgG4.

În anumite cazuri, domeniul Fc poate fi himeric, combinând secvențe Fc derivate din mai mult de un izotip de imunoglobulină. De exemplu, un domeniu Fc himeric poate cuprinde o parte sau întreaga secvență C_{H2} derivată dintr-o regiune C_{H2} umană IgG1, IgG2 umană sau IgG4 umană și o parte sau toată

secvența CH3 derivată dintr-o IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. Un domeniu Fc himeric poate conține, de asemenea, o regiune balama himeric. De exemplu, o balama himerică poate cuprinde o secvență de „balama superioară”, derivată dintr-un IgG1 uman, un IgG2 uman sau o regiune balama IgG4 umană, combinată cu o secvență „balama inferioară”, derivată dintr-un IgG1 uman, un IgG2 uman sau o regiune balama IgG4 umană. Un exemplu particular de domeniu Fc himeric care poate fi inclus în oricare dintre moleculele de legare la antigen prezentate aici cuprinde, de la N- la C-terminal: [IgG4 C_H1] - [balama superioară IgG4] - [balama inferioară IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG4 C_H3]. Un alt exemplu de domeniu himeric Fc care poate fi inclus în oricare dintre moleculele de legare la antigen prezentate aici cuprinde, de la N- la C-terminal: [IgG1 C_H1] - [balama superioară IgG1] - [balama inferioară IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG1 C_H3]. Acestea și alte exemple de domenii Fc himerice care pot fi incluse în oricare dintre moleculele de legare a antigenului sunt descrise în Publicația SUA 2014/0243504, publicată la 28 august 2014. Domeniile Fc himerice având aceste aranjamente structurale generale și variante ale acestora pot avea legarea modificată la receptorul Fc, care la rândul său afectează funcția efector Fc.

În anumite cazuri, invenția furnizează un lanț greu de anticorp în care regiunea constantă a lanțului greu (CH) cuprinde o secvență de aminoacizi cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, cel puțin 99% identic cu oricare dintre SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 sau SEQ ID NO: 1920. În unele cazuri, regiunea constantă a lanțului greu (CH) cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1914 NR: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 și SEQ ID NO: 1920.

De asemenea, aici, este descris un lanț greu de anticorp în care domeniul Fc cuprinde o secvență de aminoacizi cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, cel puțin 99% identică cu oricare dintre SECV. ID SECV NR: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 sau SEQ ID NO: 1930. În unele cazuri, domeniul Fc cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 și SEQ ID NO: 1930.

Varianțe de secvență

Anticorpii conform invenției sunt definiți prin revendicări. Alți anticorpi sunt, de asemenea, descriși aici. Anticorpii și moleculele bispecifice de legare a antigenului din prezenta invenție pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu secvențele corespunzătoare ale liniei germinale din care au fost derivate domeniile individuale de legare a antigenului. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvăluite aici cu secvențele liniei germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Moleculele de legare a antigenului pot cuprinde domenii de legare a antigenului care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi exemplificative descrise aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi dintr-unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutate la cele corespunzătoare. reziduu(i) al secvenței de linie germinală din care a derivat anticorpus sau la restul (reziduurile) corespunzătoare ale altei secvențe de linie germinală umană sau la o substituție conservativă a aminoacizilor a restului (reziduurilor) corespunzătoare din linia germinativă (se referă la astfel de modificări de secvență denumite aici în mod colectiv „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente de legare la antigen care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite cazuri, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile V_H și/sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența originală a liniei germinale din care a fost derivat inițial domeniul de legare a antigenului. În alte cazuri, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte cazuri, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate în restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinală diferită (adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența de linie germinală din care antigenul- domeniul de legare a fost derivat inițial). În plus, domeniile de legare la antigen pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă de secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, domeniile de legare a antigenului care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate cu ușurință pentru una

sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, afinitatea de legare sau de legare crescută, proprietăți biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz poate fi), imunogenitate redusă etc..

De asemenea sunt descrise aici, molecule de legare la antigen în care unul sau ambele domenii de legare la antigen cuprind variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, molecule de legare la antigen care cuprind un domeniu de legare la antigen având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici. O „substituție conservatoare de aminoacid” este una în care un rest de aminoacid este substituit cu un alt rest de aminoacid având o catenă laterală (grupare R) cu proprietăți chimice similare (de exemplu, sarcină sau hidrofobicitate). În general, o substituție conservatoare a aminoacizilor nu va schimba substanțial proprietățile funcționale ale unei proteine. Exemple de grupuri de aminoacizi care au catene laterale cu proprietăți chimice similare includ (1) catene laterale alifatic: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; (2) catene laterale alifatic-hidroxil: serină și treonină; (3) lanțuri laterale care conțin amidă: asparagină și glutamina; (4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; (5) lanțuri laterale de bază: lizină, arginină și histidină; (6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și (7) lanțuri laterale care conțin sulf sunt cisteină și metionină. Grupările de substituție de aminoacizi conservatoare preferate sunt: valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamina. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea log-probabilității PAM250 dezvăluită în Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

De asemenea, sunt descrise, aici, molecule de legare la antigen cuprinzând un domeniu de legare la antigen cu o secvență de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR care este substanțial identică cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici. Termenul „identitate substanțială” sau „substanțial identic”, atunci când se referă la o secvență de aminoacizi, înseamnă că două secvențe de aminoacizi, atunci când sunt aliniate optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT, folosind ponderi implicite ale intervalului, împărtășesc o identitate de secvență de cel puțin 95%, chiar mai preferabil cel puțin 98% sau 99% identitate de secvență. De preferință, pozițiile resturilor care nu sunt identice diferă prin substituții conservatoare de aminoacizi. În cazurile în care două sau mai multe secvențe de aminoacizi diferă una de cealaltă prin substituții conservatoare, identitatea secvenței procentuale sau gradul de similaritate poate fi ajustat în sus pentru a corecta natura conservatoare a substituției. Mijloacele pentru realizarea acestei ajustări sunt binecunoscute specialiștilor în domeniu. Vezi, de exemplu, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331.

Asemănarea secvenței pentru polipeptide, la care se face referire și ca identitate de secvență, este măsurată în mod obișnuit folosind software-ul de analiză a secvenței. Software-ul de analiză a proteinelor potrivește secvențe similare folosind măsuri de similitudine atribuite diferitelor substituții, deleții și alte modificări, inclusiv substituții conservatoare de aminoacizi. De exemplu, software-ul GCG conține programe precum Gap și Bestfit care pot fi utilizate cu parametrii implicați pentru a determina omologia secvenței sau identitatea secvenței între polipeptide strâns legate, cum ar fi polipeptide omoloage din diferite specii de organisme sau între o proteină de tip sălbatic și o muteină a acesteia. Vezi, de exemplu, GCG Versiunea 6.1. Secvențele de polipeptide pot fi, de asemenea, comparate folosind FASTA utilizând parametrii implicați sau recomandați, un program din GCG Versiunea 6.1. FASTA (de exemplu, FASTA2 și FASTA3) furnizează alinamente și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (Pearson (2000) supra). Un alt algoritm preferat atunci când se compară o secvență cu o bază de date care conține un număr mare de secvențe din diferite organisme este programul de calculator BLAST, în special BLASTP sau TBLASTN, folosind parametrii implicați. Vezi, de exemplu, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Acizi nucleici Res. 25:3389-402.

Legare dependentă de pH

Aici sunt descriși anticorpi anti-MUC16 și molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16, cu caracteristici de legare dependente de pH. De exemplu, un anticorp anti-MUC16 poate prezenta legare redusă la MUC16 la pH acid în comparație cu pH neutru. Alternativ, anticorpii anti-MUC16 pot prezenta legare sporită la MUC16 la pH acid în comparație cu pH neutru. Expresia „pH acid” include valori ale pH-ului mai mici de aproximativ 6,2, de exemplu, aproximativ 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,5, 5,3, 5,5, 5,3, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 sau mai puțin. Așa cum este utilizată aici, expresia „pH neutru” înseamnă un pH de aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,4. Expresia „pH neutru” include valori ale pH-ului de aproximativ 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 și 7,4.

În anumite cazuri, „legare redusă... la pH acid în comparație cu pH neutru” este exprimată în termeni de raport dintre valoarea K_D a anticorpului care se leagă la antigenul său la pH acid și valoarea K_D a anticorpului care se leagă la antigenul său la pH neutru (sau invers). De exemplu, un anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen poate fi considerat ca prezentând „legare redusă la MUC16 la pH acid în comparație cu pH neutru” dacă anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia prezintă un raport K_D acid/neutru de aproximativ 3,0 sau mai mare. În anumite cazuri, raportul K_D acid/neutru pentru un anticorp sau un fragment de legare la antigen poate fi aproximativ 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,0, 8,0, 8,0, , 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 sau mai mare.

Anticorpii cu caracteristici de legare dependente de pH pot fi obținuți, de exemplu, prin screening-ul unei populații de anticorpi pentru legarea redusă (sau îmbunătățită) la un anumit antigen la pH acid în comparație cu pH neutru. În plus, modificările domeniului de legare a antigenului la nivelul aminoacizilor pot produce anticorpi cu caracteristici dependente de pH. De exemplu, prin substituirea unui sau mai multor aminoacizi ai unui domeniu de legare la antigen (de exemplu, într-un CDR) cu un rest de histidină, se poate obține un anticorp cu legare de antigen redusă la pH acid relativ la pH neutru.

Anticorpi cuprinzând variante Fc

Anticorpii anti-MUC16 și moleculele bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 sunt descriși aici cuprinzând un domeniu Fc care cuprinde una sau mai multe mutații care sporesc sau diminuează legarea anticorpului la receptorul FcRn, de exemplu, la pH acid în comparație cu pH neutru. De exemplu, anticorpi care cuprind o mutație în regiunea C_H2 sau C_H3 a domeniului Fc, în care mutația (mutațiile) măresc afinitatea domeniului Fc pentru FcRn într-un mediu acid (de exemplu, într-un endozom în care pH-ul) variază de la aproximativ 5,5 până la aproximativ 6,0). Astfel de mutații pot duce la o creștere a timpului de înjumătățire plasmatică a anticorpului atunci când este administrat unui animal. Exemple nelimitative de astfel de modificări Fc includ, de exemplu, o modificare la poziția 250 (de exemplu, E sau Q); 250 și 428 (de exemplu, L sau F); 252 (de exemplu, UY/F/W sau T), 254 (de exemplu, S sau T) și 256 (de exemplu, S/R/Q/E/D sau T); sau o modificare la poziția 428 și/sau 433 (de exemplu, H/L/R/S/P/Q sau K) și/sau 434 {de exemplu, H/F sau Y); sau o modificare la poziția 250 și/sau 428; sau o modificare la poziția 307 sau 308 (de exemplu, 308F, V308F) și 434. De exemplu, modificarea cuprinde o modificare 428L (de exemplu, M428L) și 434S (de exemplu, N434S); o modificare 428L, 259I (de exemplu, V259I) și 308F (de exemplu, V308F); o modificare 433K (de exemplu, H433K) și o modificare 434 (de exemplu, 434Y); o modificare 252, 254 și 256 (de exemplu, 252Y, 254T și 256E); o modificare 250Q și 428L (de exemplu, T250Q și M428L); și o modificare 307 și/sau 308 (de exemplu, 308F sau 308P).

De exemplu, anticorpi anti-MUC16 și molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16, cuprinzând un domeniu Fc care cuprinde una sau mai multe perechi sau grupuri de mutații selectate din grupul constând din: 250Q și 248L (de exemplu, T250Q și M248L); 252Y, 254T și 256E (de exemplu, M252Y, S254T și T256E); 428L și 434S (de exemplu, M428L și N434S); și 433K și 434F (de exemplu, H433K și N434F). Toate combinațiile posibile ale mutațiilor domeniului Fc de mai sus, și alte mutații din domeniile variabile ale anticorpului dezvoltate aici, sunt avute în vedere.

Caracteristicile biologice ale anticorpilor și moleculelor bispecifice de legare la antigen

Aici sunt descriși anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă MUC16 uman cu afinitate mare (de exemplu, valori K_D subnanomolare).

Conform anumitor cazuri, prezenta dezvoltare include anticorpi și fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă MUC16 uman (de exemplu, la 25°C) cu un K_D mai mic de aproximativ 60 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 4 de aici. În anumite cazuri, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen din prezenta dezvoltare leagă MUC16 cu un K_D mai mic de aproximativ 60 nM, mai puțin de aproximativ 40 nM, mai puțin de aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 8 nM, mai puțin de aproximativ 7 nM, mai puțin de aproximativ 6 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 4 nM, mai puțin de aproximativ 3 nM, mai puțin de aproximativ 2 nM, mai puțin de aproximativ 1 nM, mai puțin de aproximativ 800 pM, mai puțin de aproximativ 800 pM aproximativ 700 pM, mai puțin de aproximativ 500 pM, mai puțin de aproximativ 400 pM sau mai puțin de aproximativ 300 pM, așa cum se măsoară prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în exemplul 4 de aici (de exemplu, captarea mAb sau antigen - format de captură), sau un test substanțial similar. Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare a antigenului (de exemplu, anticorpi bispecfici care leagă MUC16 cu un K_D mai mic de aproximativ 7 nM, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în exemplul 4 de aici (de exemplu, format mAb- de captură sau de captură a antigenului), sau un test substanțial similar.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă MUC16 cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 10 minute sau mai mare de aproximativ 125 de minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 4 de aici, sau un test substanțial similar. În anumite cazuri, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen leagă MUC16 cu un $t_{1/2}$ mai mare de aproximativ 10 minute, mai mare de aproximativ 20 de minute, mai mare de aproximativ 30 de minute, mai mare de aproximativ 40 de minute, mai mare de aproximativ 50 de minute, mai mare de aproximativ 60 de minute, mai mare de aproximativ 70 de minute, mai mare de aproximativ 80 de minute, mai mare de aproximativ 90 de minute, mai mare de aproximativ 100 de minute, mai mare de aproximativ 110 minute sau mai mare de aproximativ 120 de minute, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 4 de aici (de exemplu, format de captare mAb sau de captare a antigenului), sau un test substanțial similar. Prezenta dezvoltare include molecule bispecifice de legare a antigenului (de exemplu, anticorpi bispecfici care se leagă la MUC16 cu o valoare mai mare de aproximativ 10 minute sau mai mare de aproximativ 20 de minute, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 4 de aici, sau un test substanțial similar.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care se leagă în mod specific la liniile celulare umane care exprimă MUC16 endogen (de exemplu, OVCAR-3), așa cum s-a determinat printr-un test de detecție bazat pe electrochimiluminiscență, așa cum este prezentat în Exemplul 2 sau un test substanțial similar.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 care prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din: (a) inhibarea creșterii tumorii la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer ovarian uman; și (b); suprimarea creșterii tumorale a tumorilor stabilite la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer ovarian uman (vezi, de exemplu, Exemplul 8).

Prezenta dezvoltare include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă CD3 uman cu afinitate mare. Prezenta dezvoltare include, de asemenea, anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă CD3 uman cu afinitate medie sau scăzută, în funcție de contextul terapeutic și de proprietățile particulare de țintire care sunt dorite. În unele cazuri, afinitatea scăzută include anticorpi care leagă CD3 cu un K_D sau EC_{50} (de exemplu, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață) mai mare de 300 nM, mai mare de 500 nM sau mai mare de 1 μ M. Prezenta dezvoltare include, de asemenea, anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă CD3 uman fără afinitate măsurabilă. De exemplu, în contextul unei molecule bispecifice de legare a antigenului, în care un braț leagă CD3 și un alt braț leagă un antigen țintă (de exemplu, MUC16), poate fi de dorit ca brațul de legare a antigenului țintă să lege antigenul țintă cu afinitate în timp ce brațul anti-CD3 leagă CD3 doar cu afinitate moderată sau scăzută sau fără afinitate. În acest mod, țintirea preferențială a moleculei de legare a antigenului către celulele care exprimă antigenul țintă poate fi realizată în același timp evitând legarea CD3 generală/nețintită și efectele secundare adverse consecvente asociate cu aceasta.

Prezenta dezvoltare include molecule bispecifice de legare la antigen (de exemplu, anticorpi bispecfici) care sunt capabile să se lege simultan la CD3 uman și la un MUC16 uman. Brațul de legare care interacționează cu celulele care exprimă CD3 poate avea o legare slabă până la deloc detectabilă, așa cum este măsurată într-un test adecvat de legare in vitro. Măsura în care o moleculă bispecifică de legare a antigenului leagă celulele care exprimă CD3 și/sau MUC16 poate fi evaluată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS), așa cum este ilustrat în Exemplul 5 de aici.

De exemplu, prezenta invenție include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici ai acestora care leagă în mod specific liniile de celule T umane care exprimă CD3, dar nu exprimă MUC16 (de exemplu, Jurkat), celule T de primat (de exemplu, sânge periferic cynomolgus), celule mononucleare [PBMC] și/sau celule care exprimă MUC16.

Prezenta dezvoltare include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici ai acestora care leagă CD3 uman cu legare sau afinitate de legare slabă (adică scăzută) sau chiar inexistentă.

Prezenta dezvoltare include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici ai acestora care leagă CD3 de maimuță (adică cynomolgus) cu legare sau afinitate de legare slabă (adică scăzută) sau chiar inexistentă.

Prezenta dezvoltare include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici ai acestora care leagă CD3 uman și induc activarea celulelor T.

Prezenta dezvoltare include molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 care sunt capabile să epuizeze celulele care exprimă antigenul tumoral la un subiect (vezi, de exemplu,

Exemplul 8, într-un test imagistic bioluminescent, sau un test substanțial similar). De exemplu, în conformitate cu anumite cazuri, sunt furnizate molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16, în care o singură administrare a 10 µg de moleculă bispecifică de legare a antigenului la un subiect determină o reducere a numărului de exprimă MUC16 celule la subiect (de exemplu, creșterea tumorii la subiect este suprimată sau inhibată). Dacă nu se indică altfel, strălucirea bioluminescentă se referă la [p/s/cm²/sr].

Prezenta dezvăluire include, de asemenea, conjugați de medicament cu anticorpi anti-MUC16 care inhibă creșterea tumorii în modele in vivo de xenogrefă de cancer ovarian MUC16 pozitiv (vezi, de exemplu, Exemplul 10, într-un test imagistic bioluminescent, sau un test substanțial similar). În anumite cazuri, conjugați de medicament cu anticorpi anti-MUC16 cu Compusul 7 în care patru doze o dată pe săptămână administrate la o doză de 85 µg/kg inhibă creșterea intraperitoneală a tumorii OVCAR3/luc in vivo. În anumite cazuri, sunt furnizați conjugați de medicament cu anticorpi anti-MUC16 cu Compusul 7 în care patru doze o dată pe săptămână administrate la o doză de 85 µg/kg inhibă administrarea subcutanată.

Creșterea tumorii OVCAR3/luc in vivo. În anumite cazuri, sunt furnizați conjugați de medicament cu anticorpi anti-MUC16 cu Compusul 10 în care o singură doză la o doză de 85 µg/kg, 170 µg/kg sau 340 µg/kg inhibă creșterea tumorii OVCAR3/luc intraperitoneală in vivo. Dacă nu se indică altfel, strălucirea bioluminescentă se referă la [p/s/cm²/sr].

Prezenta dezvăluire include, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 care prezintă profiluri farmacocinetice la șoareci MUC16 x CD3 umanizați (șoareci homozigoți pentru expresia MUC16 și CD3 umane, MUC16^{hu/hu} x CD3^{hu/hu}), șoareci umanizați CD3 (șoareci homozigoți), pentru expresia CD3 umană, CD3^{hu hu} și șoareci de tip sălbatic (WT) potriviți la tulpină (75% C57BL, 25%129Sv), așa cum este descris în Exemplul 7 și prezentat în Figurile 1, 2 și 3.

Cartografierea epitopilor și tehnologiile conexe

Epitopul de pe CD3 și/sau MUC16 la care se leagă moleculele de legare a antigenului poate consta dintr-o singură secvență adiacentă de 3 sau mai multe (de exemplu, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai mulți) aminoacizi ai unei proteine CD3 sau MUC16. Alternativ, epitopul poate consta dintr-o multitudine de aminoacizi necontigui (sau secvențe de aminoacizi) ai CD3 sau MUC16. Anticorpii pot interacționa cu aminoacizii conținuți într-un singur lanț CD3 (de exemplu, CD3-epsilon, CD3-delta sau CD3-gamma) sau pot interacționa cu aminoacizi pe două sau mai multe lanțuri CD3 diferite. Termenul "epitop", așa cum este utilizat aici, se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorp cunoscută ca paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, anticorpi diferiți se pot lega la diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Epitopii pot fi fie conformaționali, fie liniari. Un epitop conformațional este produs de aminoacizi juxtapuși spațial din diferite segmente ale lanțului polipeptidic linear. Un epitop liniar este unul produs de resturile de aminoacizi adiacente dintr-un lanț polipeptidic. În anumite circumstanțe, un epitop poate include fragmente de zaharide, grupări fosforil sau grupări sulfonil de pe antigen.

Diferite tehnici cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu pot fi utilizate pentru a determina dacă un domeniu de legare la antigen al unui anticorp „interacționează cu unul sau mai mulți aminoacizi” dintr-o polipeptidă sau proteină. Tehnicile exemplificative includ, de exemplu, analiza de rutină de blocare încrucișată, cum ar fi cea descrisă Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), analiza mutațională cu scanare alaninei, analiza pe peptide (Reineke, 2004, Methods Mol Biol). 248:443-463), și analiza clivajului peptidic. În plus, pot fi folosite metode precum excizia epitopului, extracția epitopului și modificarea chimică a antigenelor (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). O altă metodă care poate fi utilizată pentru a identifica aminoacizii dintr-o polipeptidă cu care interacționează un domeniu de legare a antigenului al unui anticorp este schimbul de hidrogen/deuteriu detectat prin spectrometrie de masă. În termeni generali, metoda de schimb hidrogen/deuteriu implică marcarea cu deuteriu a proteinei de interes, urmată de legarea anticorpului de proteina marcată cu deuteriu. Apoi, complexul proteină/anticorp este transferat în apă pentru a permite schimbul hidrogen-deuteriu să aibă loc la toate reziduurile, cu excepția reziduurilor protejate de anticorp (care rămân marcate cu deuteriu). După disocierea anticorpului, proteina țintă este supusă scindării cu protează și analizei spectrometriei de masă, dezvăluind astfel reziduurile marcate cu deuteriu care corespund aminoacizilor specifici cu care interacționează anticorpul. Vezi, de exemplu, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen și Smith (2001) Anal. Chim. 73:256A-265A. Cristalografia cu raze X a complexului antigen/anticorp poate fi de asemenea utilizată în scopuri de cartografiere a epitopilor.

Anticorpul conform invenției sunt definiți prin revendicări. Alți anticorpi sunt, de asemenea, descriși aici. Prezenta dezvăluire include în plus anticorpi anti-MUC16 care se leagă la același epitop ca oricare dintre anticorpul exemplificativ specific descriși aici (de exemplu, anticorpi cuprinzând oricare dintre secvențele de aminoacizi, așa cum este prezentat în Tabelul 1 de aici). De asemenea, prezenta

5 dezvăluire include, de asemenea, anticorpi anti-MUC16 care concurează pentru legarea la MUC16 cu oricare dintre anticorpul exemplificativ specific descriși aici (de exemplu, anticorpi care cuprind oricare dintre secvențele de aminoacizi așa cum este prezentat în Tabelul 1 de aici). Cu toate acestea, doar un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în

10 mod specific MUC16 uman, în care al doilea domeniu de legare la antigen cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32, așa cum sunt definite în revendicări, sunt în sfera anticorpilor din invenția revendicată.

Prezenta dezvăluire include, de asemenea, molecule bispecifice de legare a antigenului care cuprind un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman și/sau cynomolgus CD3 cu legare sau afinitate de legare scăzută sau deloc detectabilă și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman, în care primul domeniu de legare a antigenului se leagă la același epitop de pe CD3 ca oricare dintre domeniile de legare a antigenului specific CD3 exemplificative descrise aici și/sau în care al doilea domeniu de legare a antigenului se leagă la același

20 epitop pe MUC16 ca oricare dintre exemple specifice de domenii specifice de legare a antigenului MUC16 descrise aici.

De asemenea, prezenta dezvăluire include, de asemenea, molecule bispecifice de legare a antigenului care cuprind un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16 uman, în care primul

25 domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la CD3, cu oricare dintre domeniile specifice de legare a antigenului CD3 exemplificative descrise aici și/sau în care al doilea domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la MUC16 cu oricare dintre domeniile specifice de legare a antigenului MUC16 exemplificative descrise aici.

Se poate determina cu ușurință dacă o anumită moleculă de legare a antigenului (de exemplu, anticorp) sau domeniul de legare a antigenului al acestuia se leagă de același epitop ca, sau concurează pentru legarea cu, o moleculă de legare a antigenului de referință prin utilizarea metodelor de rutină cunoscute. În art. De exemplu, pentru a determina dacă un anticorp de testat se leagă de același epitop pe MUC16 (sau CD3) ca o moleculă de referință bispecifică de legare a antigenului, moleculei bispecifice de referință i se permite mai întâi să se lege la o proteină MUC16 (sau proteină CD3). Apoi, se evaluează

30 capacitatea unui anticorp de testare de a se lega la molecula MUC16 (sau CD3). Dacă anticorpul de testat este capabil să se lege la MUC16 (sau CD3) după legarea prin saturație cu molecula de referință bispecifică de legare a antigenului, se poate concluziona că anticorpul de testat se leagă la un epitop diferit de MUC16 (sau CD3) decât antigenul bispecific de referință -molecula de legare. Pe de altă parte, dacă anticorpul de testat nu este capabil să se lege la molecula MUC16 (sau CD3) după legarea prin saturație cu molecula de referință de legare a antigenului bispecific, atunci anticorpul de testat se poate

40 lega de același epitop al MUC16 (sau CD3) ca epitop legat de molecula bispecifică de referință de legare la antigen. Experimentarea de rutină suplimentară (de exemplu, mutația peptidică și analizele de legare) pot fi apoi efectuate pentru a confirma dacă lipsa observată de legare a anticorpului de testat se datorează, de fapt, legării la același epitop ca molecula bispecifică de referință de legare la antigen sau dacă este

45 steric. blocarea (sau alt fenomen) este responsabilă pentru lipsa legăturii observate. Experimentele de acest fel pot fi efectuate utilizând ELISA, RIA, Biacore, citometrie în flux sau orice alt test cantitativ sau calitativ de legare a anticorpilor disponibil în domeniu. În conformitate cu anumite cazuri ale prezentei invenții, două proteine de legare la antigen se leagă la același epitop (sau care se suprapun) dacă, de exemplu, un exces de 1, 5, 10, 20 sau 100 de ori dintr-o legare la antigen, proteina inhibă legarea

50 celeilalte cu cel puțin 50%, dar de preferință 75%, 90% sau chiar 99%, măsurată într-un test de legare competitivă (vezi, de exemplu, Junghans și colab., Cancer Res. 1990:50: 1495-1502). Alternativ, se consideră că două proteine de legare la antigen se leagă la același epitop dacă în esență toate mutațiile de aminoacizi din antigen care reduc sau elimină legarea unei proteine de legare la antigen reduc sau elimină legarea celeilalte. Se consideră că două proteine de legare la antigen au „epitopi suprapuneri” dacă doar

55 un subset de mutații de aminoacizi care reduc sau elimină legarea unei proteine de legare la antigen reduce sau elimină legarea celeilalte.

Pentru a determina dacă un anticorp sau un domeniu de legare la antigen al acestuia concurează pentru legarea cu o moleculă de legare a antigenului de referință, metodologia de legare descrisă mai sus este efectuată în două orientări: într-o primă orientare, moleculei de legare a antigenului de referință i se

permite să se lege la o proteină MUC16 (sau proteină CD3) în condiții de saturare urmată de evaluarea legării anticorpului de testat la molecula MUC16 (sau CD3). Într-o a doua orientare, anticorpul de testat este lăsat să se lege la o moleculă MUC16 (sau CD3) în condiții de saturare urmată de evaluarea legării moleculei de legare a antigenului de referință la molecula MUC16 (sau CD3). Dacă, în ambele orientări, numai prima moleculă (saturatoare) de legare a antigenului este capabilă să se lege de molecula MUC16 (sau CD3), atunci se ajunge la concluzia că anticorpul de testat și molecula de referință de legare a antigenului concurează pentru legarea la MUC16 (sau CD3). După cum va fi apreciat de o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, un anticorp care concurează pentru legarea cu o moleculă de legare a antigenului de referință poate să nu se lege neapărat de același epitop ca și anticorpul de referință, dar poate bloca steric legarea anticorpului de referință prin legând un epitop suprapus sau adiacent.

Prepararea domeniilor de legare a antigenului și construcția moleculelor bispecifice

Domeniile de legare a antigenului specifice pentru antigeni particulari pot fi preparate prin orice tehnologie de generare a anticorpilor cunoscută în domeniu. Odată obținute, două domenii diferite de legare la antigen, specifice pentru doi antigene diferiți (de exemplu, CD3 și MUC16), pot fi aranjate în mod corespunzător unul față de celălalt pentru a produce o moleculă bispecifică de legare a antigenului utilizând metode de rutină. (O discuție despre formatele de anticorpi bispecifice exemplificative care pot fi utilizate pentru a construi moleculele bispecifice de legare a antigenului este furnizată în altă parte aici). În anumite cazuri, una sau mai multe dintre componentele individuale (de exemplu, lanțuri grele și ușoare) ale moleculelor de legare la antigen multispecifice ale invenției sunt derivate din anticorpi himeric, umanizați sau complet umani. Metodele pentru producerea unor astfel de anticorpi sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, unul sau mai multe dintre lanțurile grele și/sau ușoare ale moleculelor bispecifice de legare a antigenului pot fi preparate utilizând tehnologia VELOCIMM UNE™. Folosind Tehnologia VELOCIMMUNE™ (sau orice altă tehnologie de generare a anticorpilor umani), anticorpii himeric de mare afinitate la un anumit antigen (de exemplu, CD3 sau MUC16) sunt inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii sunt caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, inclusiv afinitatea, selectivitatea, epitopul etc. Regiunile constante de șoarece sunt înlocuite cu o regiune constantă umană dorită pentru a genera lanțuri grele și/sau ușoare complet umane care pot fi încorporate în moleculele bispecifice de legare a antigenului.

[Animalele modificate genetic pot fi utilizate pentru a face molecule umane bispecifice de legare a antigenului. De exemplu, poate fi utilizat un șoarece modificat genetic care este incapabil să rearanjeze și să exprime o secvență variabilă de lanț ușor de imunoglobuline de șoarece endogene, în care șoarecele exprimă doar unul sau două domenii variabile ale lanțului ușor uman codificate de secvențe de imunoglobuline umane legate operabil la kappa de șoarece, genă constantă la locusul kappa endogen al șoarecelui. Astfel de șoareci modificați genetic pot fi utilizați pentru a produce molecule de legare a antigenului bispecific complet uman, cuprinzând două lanțuri grele diferite care se asociază cu un lanț ușor identic care cuprinde un domeniu variabil derivat dintr-unul dintre cele două segmente de gene diferite ale regiunii variabile ale lanțului ușor uman. (A se vedea, de exemplu, US 2011/0195454). Complet uman se referă la un anticorp, sau fragment de legare la antigen sau domeniu de imunoglobulină al acestuia, cuprinzând o secvență de aminoacizi codificată de un ADN derivat dintr-o secvență umană pe toată lungimea fiecărei polipeptide a anticorpului sau fragment de legare la antigen sau domeniul de imunoglobulină al acestuia. În unele cazuri, secvența complet umană este derivată dintr-o proteină endogenă unui om. În alte cazuri, proteina sau secvența proteică complet umană cuprinde o secvență himerică în care fiecare secvență componentă este derivată din secvența umană. Deși nu sunt legate de nicio teorie, proteinele himerice sau secvențele himerice sunt în general concepute pentru a minimiza crearea de epitopi imunogeni în joncțiunile secvențelor componente, de ex. comparativ cu orice regiuni sau domenii ale imunoglobulinei umane de tip sălbatic.

Bioechivalenți

Anticorpii conform invenției sunt definiți prin revendicări. Alți anticorpi sunt, de asemenea, descriși aici. Prezenta dezvăluire cuprinde molecule de legare la antigen având secvențe de aminoacizi care variază de cele ale moleculelor exemplificative descrise aici, dar care păstrează capacitatea de a lega CD3 și/sau MUC16. Astfel de molecule variante pot cuprinde una sau mai multe adăugiri, deleții sau substituții de aminoacizi în comparație cu secvența părinte, dar prezintă activitate biologică care este în esență echivalentă cu cea a moleculelor bispecifice de legare la antigen descrise.

Prezenta dezvăluire include molecule de legare la antigen care sunt bioechivalente cu oricare dintre moleculele exemplificative de legare la antigen prezentate aici. Două proteine de legare a antigenului, sau anticorpi, sunt considerate bioechivalente dacă, de exemplu, sunt echivalente farmaceutice sau alternative farmaceutice a căror rată și grad de absorbție nu prezintă o diferență semnificativă atunci când sunt administrate la aceeași doză molară în condiții experimentale similare, fie singure, face sau doze multiple. Unele proteine care leagă antigenul vor fi considerate echivalente sau

alternative farmaceutice dacă sunt echivalente în gradul lor de absorbție, dar nu în rata lor de absorbție și totuși pot fi considerate bioechivalente deoarece astfel de diferențe în rata de absorbție sunt intenționate și se reflectă în etichetarea, nu sunt esențiale pentru atingerea concentrațiilor efective ale medicamentului în organism, de exemplu, pentru utilizarea cronică și sunt considerate ne semnificative din punct de vedere medical pentru produsul medicamentos studiat.

De exemplu, două proteine de legare la antigen sunt bioechivalente dacă nu există diferențe semnificative clinic în ceea ce privește siguranța, puritatea și potența lor.

De exemplu, două proteine care leagă antigenul sunt bioechivalente dacă un pacient poate fi schimbat o dată sau de mai multe ori între produsul de referință și produsul biologic fără o creștere așteptată a riscului de efecte adverse, inclusiv o modificare semnificativă clinic a imunogenității sau diminuarea eficacității, în comparație cu terapia continuată fără o astfel de schimbare.

De exemplu, două proteine de legare la antigen sunt bioechivalente dacă ambele acționează printr-un mecanism comun sau mecanisme de acțiune pentru starea sau condițiile de utilizare, în măsura în care astfel de mecanisme sunt cunoscute.

Bioechivalența poate fi demonstrată prin metode in vivo și in vitro. Măsurile de bioechivalență includ, de exemplu, (a) un test in vivo la oameni sau alte mamifere, în care concentrația anticorpului sau a metaboliților săi este măsurată în sânge, plasmă, ser sau alt fluid biologic în funcție de timp; (b) un test in vitro care a fost corelat cu datele de biodisponibilitate umană in vivo și care previne în mod rezonabil pentru acestea; (c) un test in vivo la oameni sau alte mamifere în care efectul farmacologic acut adecvat al anticorpului (sau al țintei acestuia) este măsurat în funcție de timp; și (d) într-un studiu clinic bine controlat care stabilește siguranța, eficacitatea sau biodisponibilitatea sau bioechivalența unei proteine care leagă antigenul.

Variantele bioechivalente ale moleculelor bispecifice de legare la antigen prezentate aici pot fi construite, de exemplu, prin efectuarea diferitelor substituții de resturi sau secvențe sau eliminând resturile sau secvențele terminale sau interne care nu sunt necesare pentru activitatea biologică. De exemplu, resturile de cisteină care nu sunt esențiale pentru activitatea biologică pot fi șterse sau înlocuite cu alți aminoacizi pentru a preveni formarea de punți disulfură intramoleculare inutile sau incorecte la renaturare. În alte contexte, proteinele bioechivalente de legare a antigenului pot include variante ale moleculelor bispecifice exemplificative de legare a antigenului prezentate aici, cuprinzând modificări de aminoacizi care modifică caracteristicile de glicozilare ale moleculelor, de exemplu, mutații care elimină sau îndepărtează glicozilarea.

Selectivitatea speciilor și reactivitatea încrucișată a speciilor

Conform anumitor cazuri, sunt descrise molecule de legare la antigen care se leagă la CD3 uman, dar nu la CD3 de la alte specii. De asemenea, sunt furnizate molecule de legare la antigen care se leagă la MUC16 uman. Prezenta descriere include, de asemenea, molecule de legare la antigen care se leagă la CD3 uman și la CD3 de la una sau mai multe specii non-umane; și/sau molecule de legare la antigen care se leagă la MUC16 uman.

Conform anumitor cazuri exemplificative, sunt furnizate molecule de legare la antigen care se leagă la CD3 uman și/sau MUC16 uman și se pot lega sau nu, după caz, la unul sau mai multe dintre șoarece, șobolan, cobai, hamster, gerbil, porc, pisică, câine, iepure, capră, oaie, vacă, cal, cămilă, cynomolgus, marmoset, rhesus sau cimpanzeu CD3 și/sau MUC16. De exemplu, într-un caz exemplificativ particular sunt furnizate molecule bispecifice de legare la antigen care cuprind un prim domeniu de legare la antigen care leagă CD3 uman și CD3 cynomolgus, și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman.

Conjugate de medicament-anticorp (ADC)

Anticorpul conform invenției sunt definiți prin revendicări. Alți anticorpi sunt, de asemenea, descriși aici conjugate anticorp-medicament (ADC) cuprinzând un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen conjugat la o porțiune terapeutică cum ar fi un agent citotoxic, un medicament chimioterapeutic, imunosupresor sau un radioizotop. În termeni generali, ADC-urile cuprind: A - [L - P]_y, în care A este o moleculă de legare la antigen, de ex. un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia (de exemplu, un fragment care cuprinde cel puțin un HCDR3 selectat din oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR3 enumerate în Tabelul 1), L este un linker, P este sarcina utilă sau fragmentul terapeutic (de exemplu, agent citotoxic), iar y este un număr întreg de la 1 la 30. În diferite cazuri, ADC cuprinde un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia care leagă antigenul care cuprinde CDR-urile unui HCVR și un LCVR având secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NOs (de exemplu, SEQ ID NOs: 2 și 10) setului prezentate în Tabelul 1, sau perechi specifice HCVR/LCVR (de exemplu, SEQ ID NO: 2/10). În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 cuprinde CDR-uri cu secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NOs (de exemplu, SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16) prezentate în

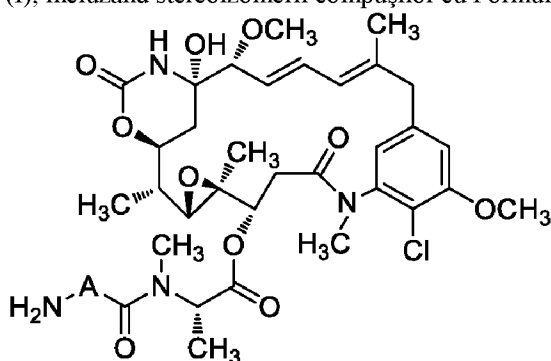
Tabelul 1. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 cuprinde un HCVR și un LCVR având secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO(de exemplu, SEQ ID NO: 2 și 10) prezentate în Tabelul 1 sau perechi de secvențe de aminoacizi specifice (de exemplu, SEQ ID NO: 2/10). În unele cazuri, anticorpul anti-MUC16 este un anticorp sau un fragment de legare la antigen care se leagă la MUC16 uman în unul sau mai multe dintre cele cinci domenii SEA proximale ale membranei ale MUC16 uman care corespund resturilor 13791 -14451 din SEQ ID NO: 1899. În unele cazuri, anticorpul anti-MUC16 este un anticorp sau un fragment de legare la antigen care leagă MUC16 uman în resturile 13810-14451 din SECV I D NR: 1899. În unele cazuri, anticorpul anti-MUC16 este un anticorp sau un fragment de legare la antigen care se leagă la oricare dintre mai multe dintre SEA1, SEA2, SEA3, SEA4, SEA5, SEA6, SEA7, SEA8, SEA9, SEA10, SEA11, SEA12, SEA13, SEA14, SEA15 sau SEA16 al MUC16 uman. Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA1 (reziduurile 12074 până la 12229 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA2 (reziduurile 12230 până la 12387 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA3 (reziduurile 12388 până la 12543 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA4 (reziduurile 12544 până la 12698 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA5 (reziduurile 12699 până la 12854 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA6 (reziduurile 12855 până la 13010 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA7 (reziduurile 13011 până la 13166 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA8 (reziduurile 13167 până la 13323 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA9 (reziduurile 13324 până la 13478 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA10 (reziduurile 13479 până la 13634 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA11 (reziduurile 13635 până la 13790 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA12 (reziduurile 13791 până la 13923 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA13 (reziduurile 13924 până la 14074 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA14 (reziduurile 14075 până la 14227 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA15 (reziduurile 14228 până la 14320 din SEQ ID NO: 1899). Într-un caz, anticorpul sau fragmentul anti-MUC16 se leagă în SEA16 (reziduurile 14321 până la 14464 din SEQ ID NO: 1899). De exemplu, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă la MUC16 uman într-un epitop variind de la restul 428 la restul 481 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 428-434, 429-434, 453-467, 459-467, 460-467 și/sau 474-481 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 428-434, 429-434, 453-467, 459-467, 460-467 și 474-481 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul izolat sau Fragmentul de legare la antigen al acestuia leagă MUC16 uman într-un epitop variind de la restul 126 la restul 138 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 126-131, 127-131 și /sau 132-138 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 126-131, 127-131 și 132-138 din SEQ ID NO: 1902. Dezvăluirea furnizează suplimentar un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care leagă MUC16 uman într-un epitop variind de la restul 357 la restul 369 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 357-369, 358-366, 358-369 și/sau 361-369 din SEQ ID NO: 1902. În unele cazuri, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen interacționează cu resturile de aminoacizi 357-369, 358-366, 358-369 și 361 -369 din SEQ ID NO: 1902. Într-un caz, dezvăluirea furnizează un anticorp bispecific anti-CD3/anti-MUC16, care cuprinde un braț de legare anti-MUC16 care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1959 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960 și un braț de legare anti-CD3 care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1961 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960. Într-un alt caz, dezvăluirea furnizează un anticorp bispecific anti-CD3/anti-MUC16, care cuprinde un braț de legare anti-MUC16 care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1959 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1960 și un braț de legare anti-CD3 care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1962 și un lanț ușor cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1960. Cu toate acestea, doar un anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia, așa cum este definit în revendicări, este în scopul anticorpilor din invenția revendicată.

Agenții citotoxici includ orice agent care dăunează creșterii, viabilității sau propagării celulelor. Moleculele sau anticorpii care leagă antigenul conform invenției livrează acești agenți citotoxici, denumiți

aici „încărcări utile”, celulelor țintă. Exemple de agenți citotoxici adecvați și agenți chimioterapeutici pentru formarea ADC-urilor sunt cunoscute în domeniu.

Exemple de agenți citotoxici adecvați și agenți chimioterapeutici care pot fi conjugați cu anticorpi anti-MUC16 în conformitate cu acest aspect al invenției includ, de exemplu, 1-(2-cloretil)-1,2-dimetansulfonil hidrazida, 1,8-dihidroxi-biciclo[7.3.1]trideca-4,9-dienă-2,6-diină-13-onă, 1-dehidrotestosteron, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurină, 6-tioguanină, 9-amino camptotecină, actinomicina D, amanitine, aminopterina, anguidină, antraciclina, antramicină (AMC), auristatine (monometil auristatin E sau monometil auristatin F), bleomicina, busulfan, acid butiric, calicheamicin, camptotecină, carminomicin, carmustină, cemadotină, cisplatină, colchicină, combretastaină, ciclofosfamidă, citarabină, B citocalasin, dactinomicină, daunorubicină, decarbazină, diacetoxipentildoxorubicină, dibromomanitol, dihidroxi antracina dionă, dizorazoli, dolastatin, doxorubicină, duocarmicină, echinomicină, eleuterobine, emetină, epotilone, esperamicină, estramistine, bromidă etidium, etposidă, floruracile, geldanamicine, gramicidin D, glucocorticoizi, irinotecan, leptomicine, leurozine, lidocaina, lomustina (CCNU), maitansinoide, mecloretamina, melfalan, mercaptopurine, metopterine, metotrexat, mitramicină, mitomicina, mitoxantrona, N8-acetil spermidă, podofilotoxine, procaină, propanolol, pteridine, puromicina, rizoxine, streptozotocină, talizomicină, taxol, tenopozidă, tetracaină, tiepa clorambucil, tomamicină, topotecan, tubulizină, vinblastină, vincristină, vindesină, vinorelbine și derivați ai oricăreia dintre cele de mai sus.

Conform anumitor cazuri, agentul citotoxic care este conjugat cu un anticorp anti-MUC16 este o auristatina, cum ar fi monometil auristatin E (MMAE) sau monometil auristatin F (MMAF), o tubulizină cum ar fi TUB-OH sau TUB-OMOM, o tomamicină derivat, un derivat de dolastatin sau un maitansinoid cum ar fi DM1 sau DM4. În unele cazuri, agentul citotoxic este un maitansinoid având structura cu Formula (I), incluzând stereoisomerii compușilor cu Formula (I):



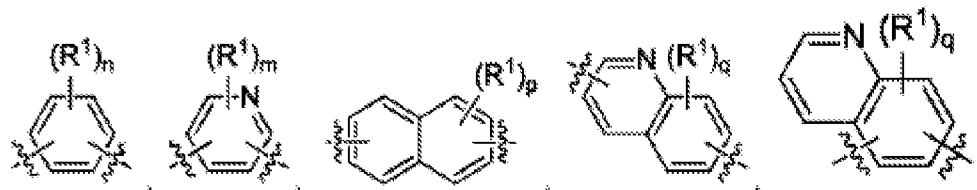
(Formula I)

în care A este arilenă sau heteroarilenă.

În unele cazuri, A este un radical divalent de benzen, piridină, naftalenă sau chinolonă, care sunt opțional substituie.

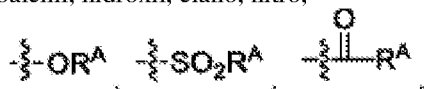
În unele cazuri, A este arilenă.

În unele cazuri A este:



în care:

R¹ este, independent la fiecare apariție, alchil, alchenil, alchi aralchii, halo, heteroaril, heterocicloalchil, hidroxil, ciano, nitro,



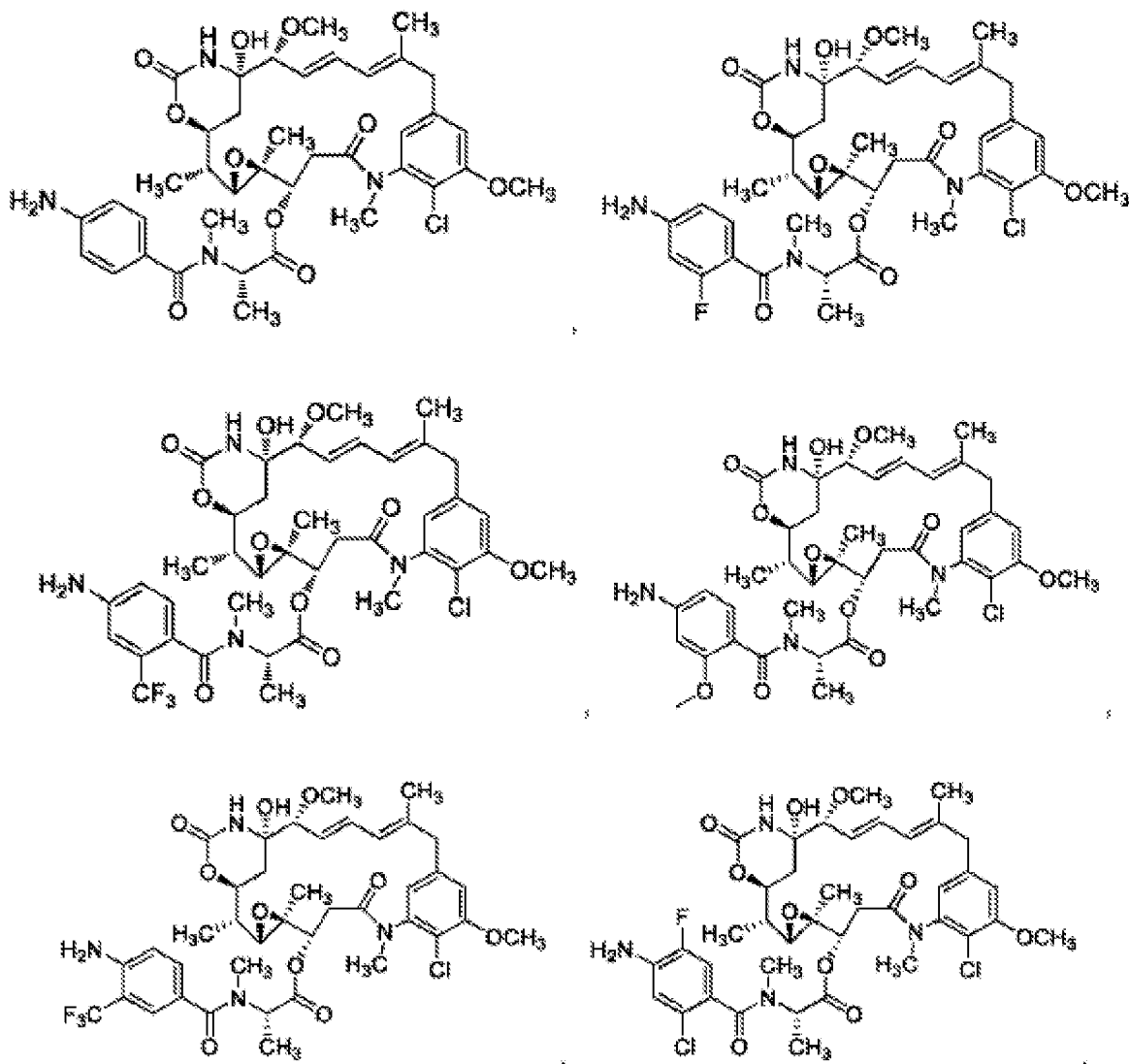
sau azido, în care R^A este alchil sau heteroalchil;

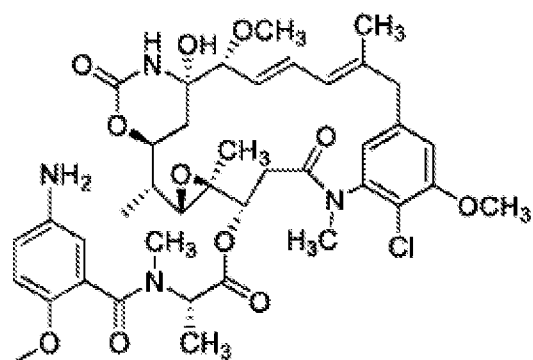
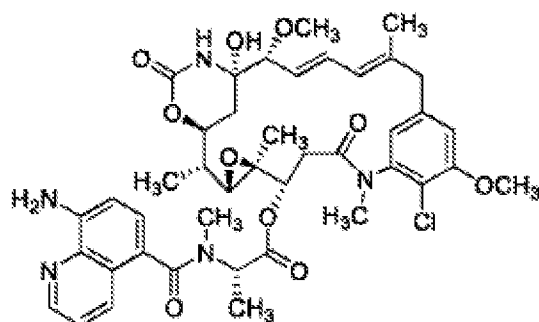
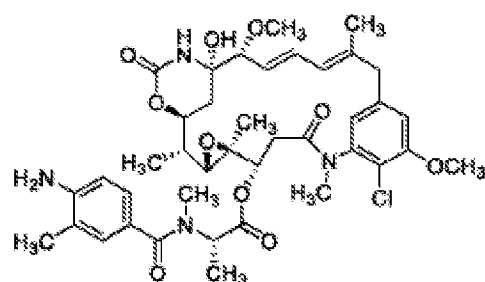
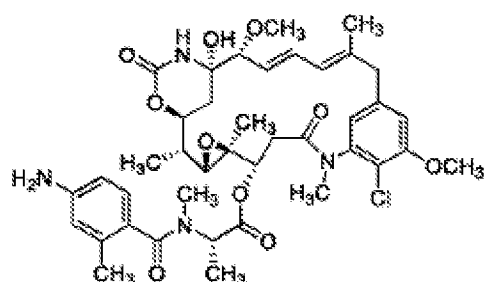
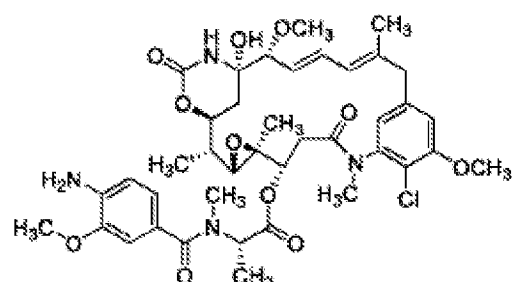
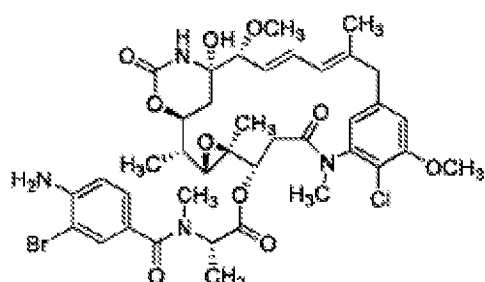
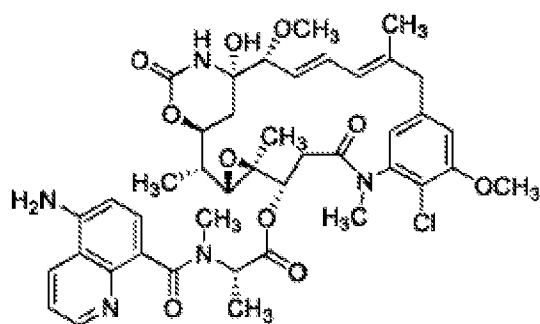
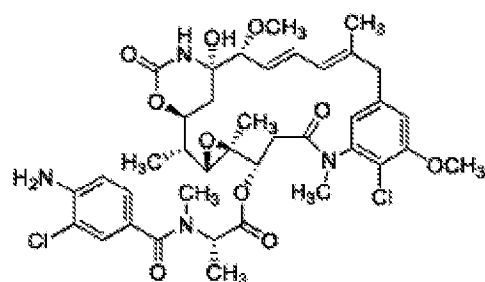
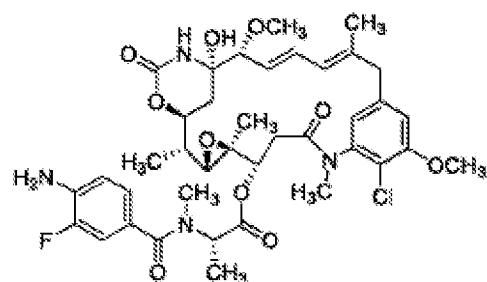
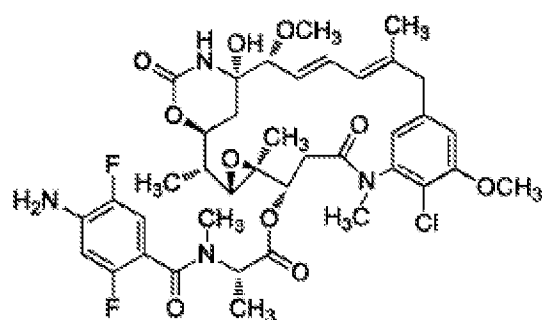
n este un număr întreg de la 0 la 4;

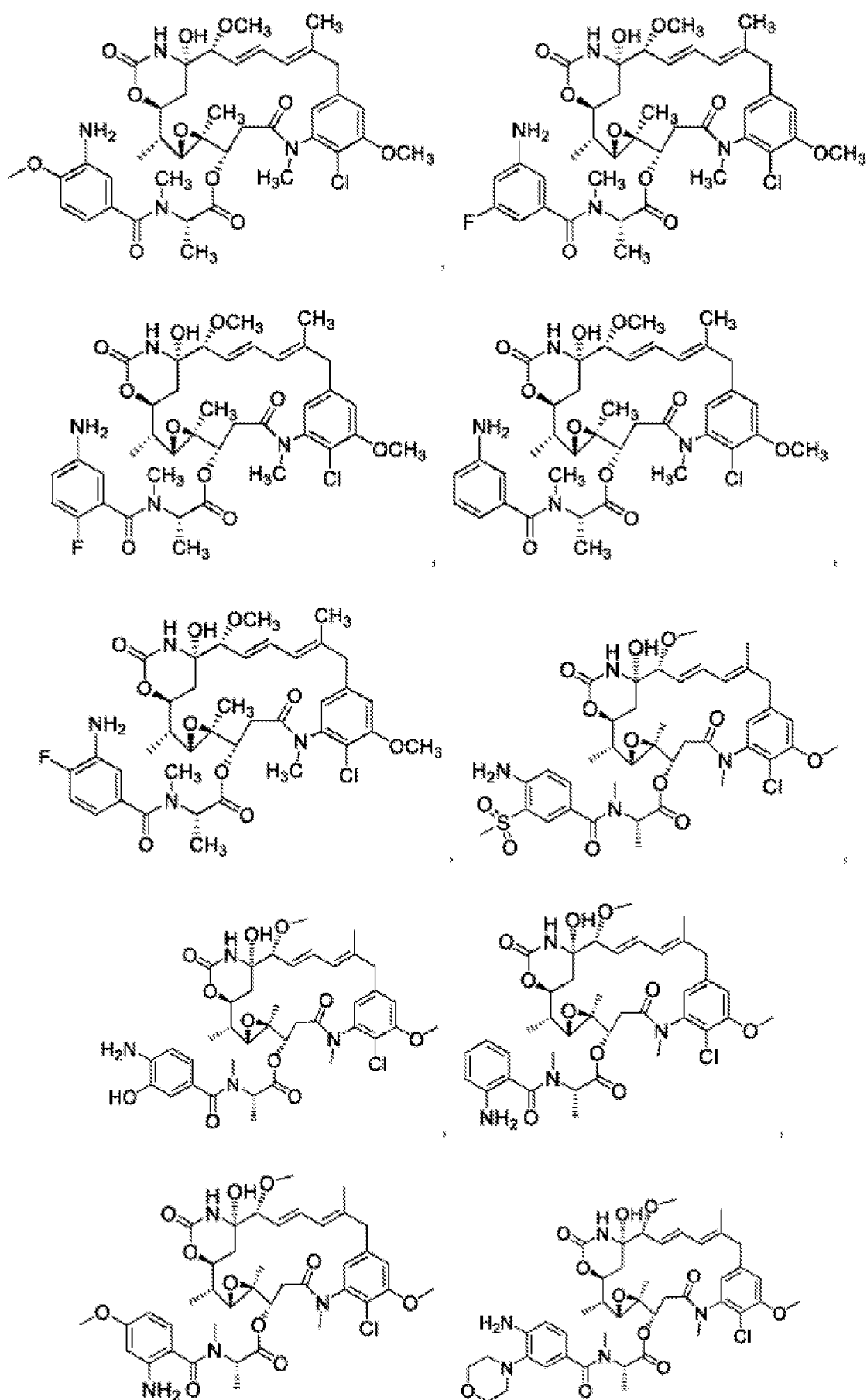
m este un număr întreg de la 0 la 3;
p este un număr întreg de la 0 la 6; și
q este un număr întreg de la 0 la 5.

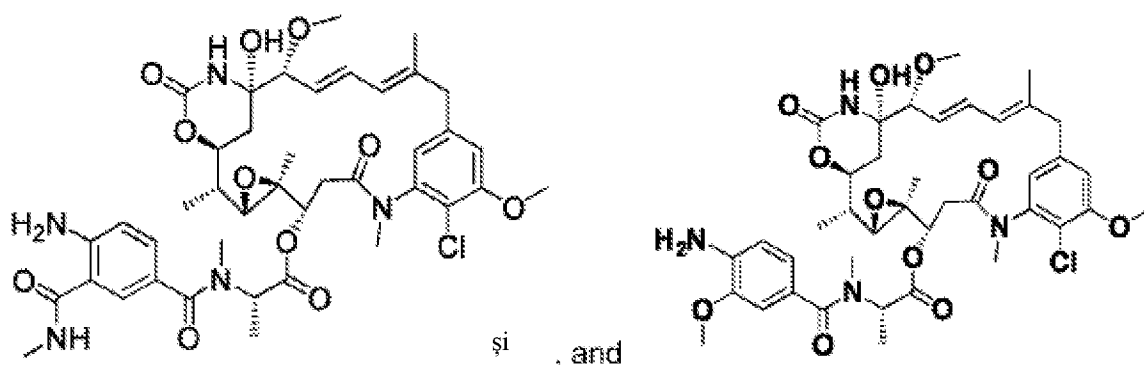
5

În unele cazuri, compusul cu Formula I este selectat din grupul constând

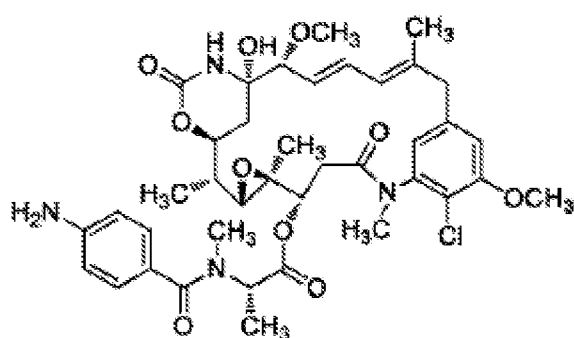




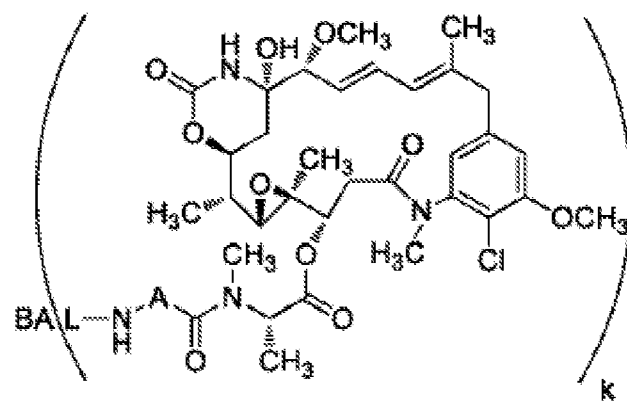




De exemplu, compusul cu formula (I) este:

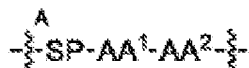


- 5 În unele cazuri, maitansinoidul cu Formula (I) este conjugat la un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen prin intermediul unui linker, așa cum se arată în Formula (IA), mai jos:



(Formula IA)

- 10 în care:
 A este arilenă sau heteroarilenă, așa cum sa discutat mai sus în legătură cu Formula (I);
 L este un linker;
 BA este un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen; și
 k este un număr întreg de la 1 la 30.
- 15 În diferite variante de realizare, L este:



în care:

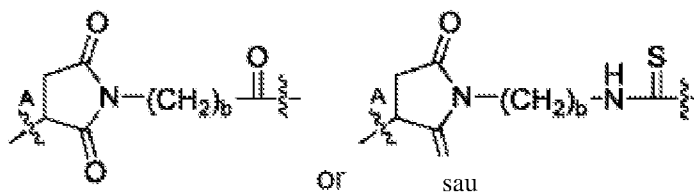
SP este un distanțier; s este una sau mai multe legături la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia;

AA¹ este un aminoacid; și

AA² este un aminoacid.

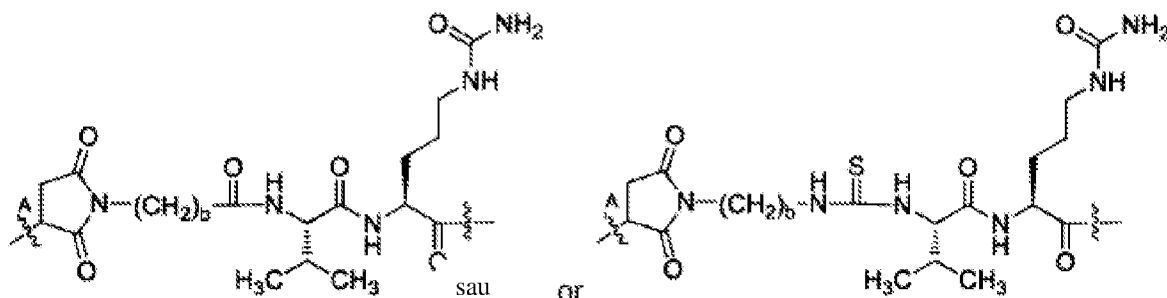
5 În unele cazuri, AA¹-AA² este: valină-citrulină, citrulină-valină, lizină-fenilalanină, fenilalanină-lizină, valină-asparagină, asparagină-valină, treonină-asparagină, asparagină-treonină, serină-asparagină, asparagină-serină, asparagină, asparagină-fenilalanină, leucină-asparagină, asparagină-leucină, izoleucină-asparagină, asparagină-izoleucină, glicină-asparagină, asparagină-glicină, acid glutamic-asparagină, asparagină-acid glutamic, citrulină-asparagină, asparagină-citrulină asparagină sau

10 asparagină-alanină.
În unele cazuri, SP este:



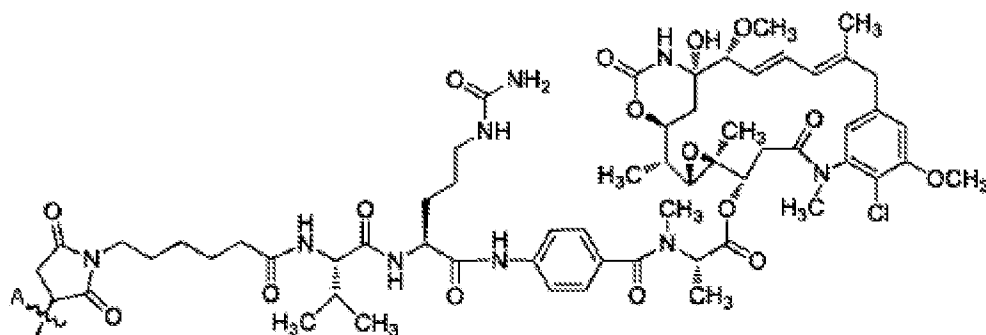
15 în care: este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia; și
b este un număr întreg de la 2 la 8.

În alte variante de realizare, L este:



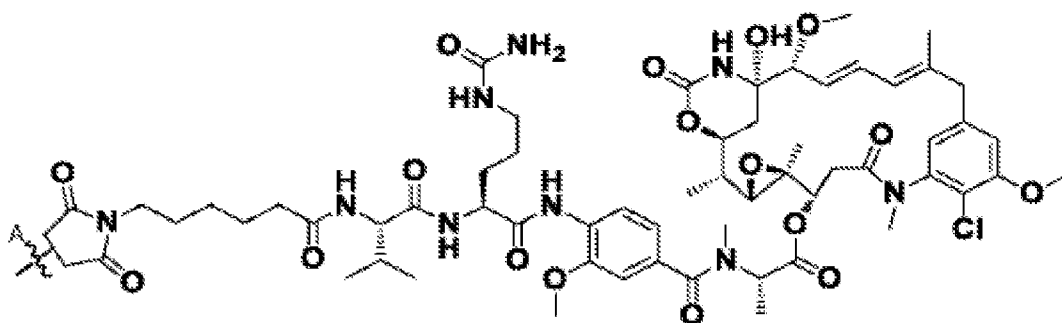
20 în care: este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragment al acestuia; și b este un număr întreg de la 2 la 8.

De exemplu, compusul cu Formula (IA), incluzând linkerul, care este legat de anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia de legare la antigen este:



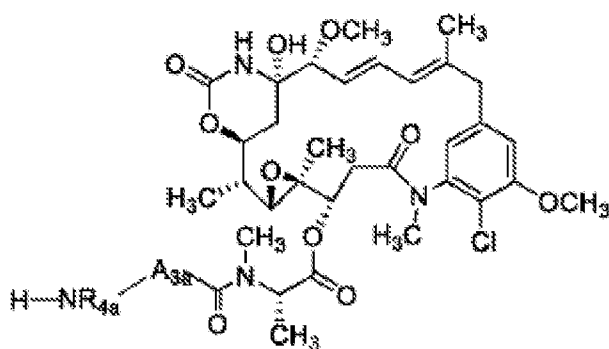
25 în care este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia. În unele cazuri, acest fragment este denumit „Compus 10.”

De exemplu, compusul cu Formula (IA), incluzând linkerul, care este legat de anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia de legare la antigen este:



în care  este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragment al acestuia. În unele cazuri, acest fragment este denumit „Compus 60.”

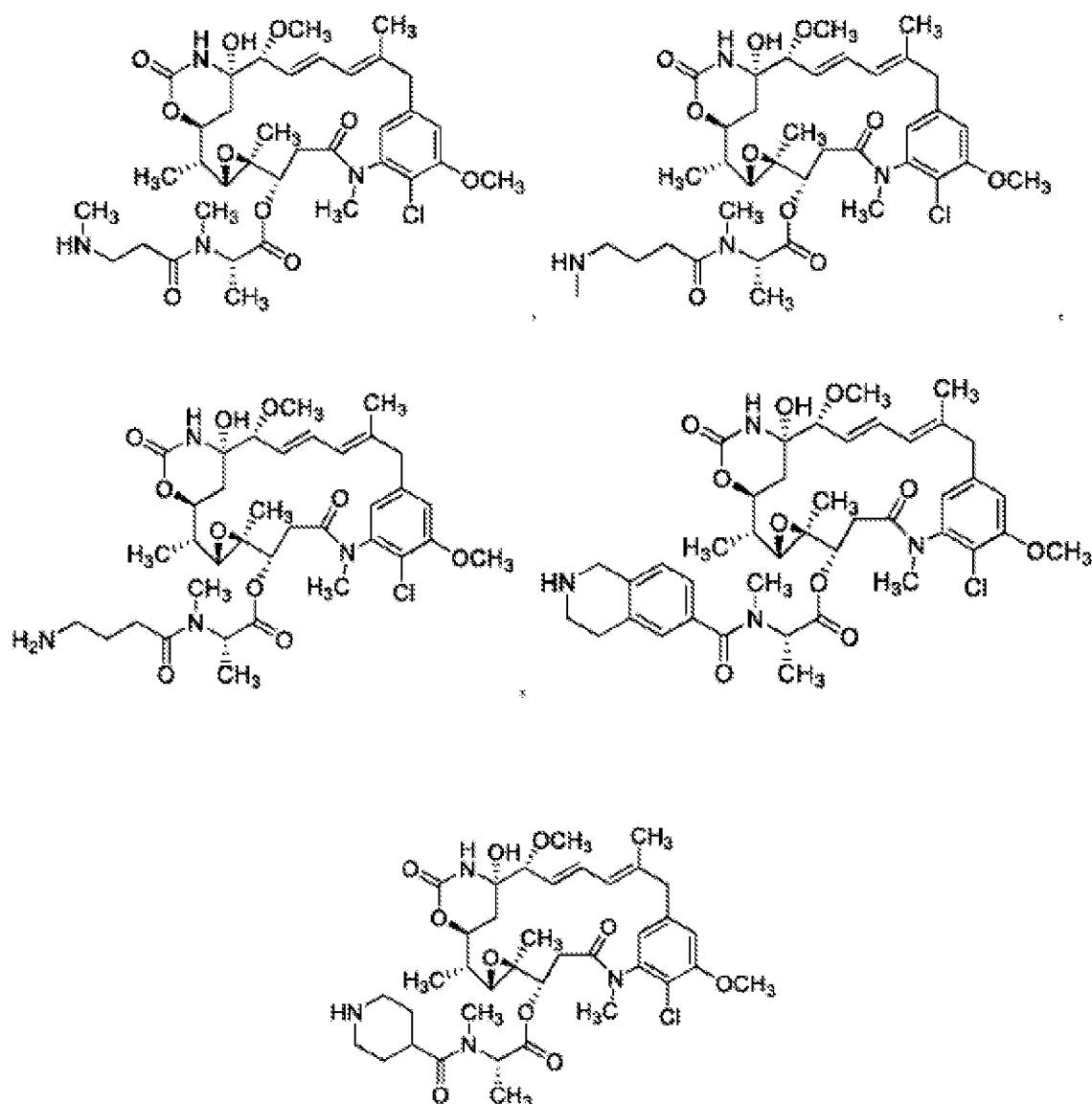
În unele realizări, agentul citotoxic este un maitansinoid având structura cu Formula (II),
5 incluzând stereoizomerii compușilor cu Formula (II):



(Formula II)

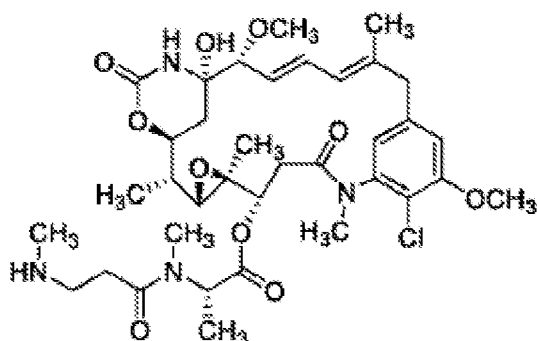
în care:

- A_{3a} este un aminoacid, o peptidă având 2-20 aminoacizi, un alchil, un alchinil, un alchenil,
10 cicloalchil, un aril, un heteroaril, un heterociclic, $-CR_5R_6$ -, $-O$ -, $-C(=O)$ -,
 $-O-C(=O)$ -, $-C(=O)-O$ -, $-O-C(=O)-O$ -, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$ -, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$ -,
 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)$ -, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O$ -, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}$ -, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}$ -, $-C(=S)$ -,
 $-C(=S)-S$ -, $-C(=S)-NH$ -, $-S-C(=S)$ -, $-S-C(=S)-S$ -, $-S$ -, $-SO$ -, $-SO_2$ -,
15 $-NR_4$ -, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)$ -, $-N(R_4)-C(=O)-O$ -, $-N(R_4)-C(=O)$ -, $-C(=O)-N(R_4)$ -,
 $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)$ -, sau $-O-C(=O)-NR_4$ -, în care alchil, alchinil, alchenil, cicloalchil, aril,
heteroaril și heterociclic sunt opțional substituiți ; și
 $p1$, $p2$ și $p3$ sunt fiecare independent 0, sau un număr întreg de la 1 la 100;
 x este 0, 1 sau 2;
 R_4 , R_5 , R_6 și R_8 sunt fiecare independent H, sau un substituit sau nesubstituit: alchil, alchenil,
20 alchinil, aril, heteroaril sau heterociclic; și
 R_{4a} este un substituit sau nesubstituit: alchil, alchenil, alchinil, aril, heteroaril sau heterociclic.
În unele cazuri, compusul cu Formula (I I) este selectat din grupul constând din:



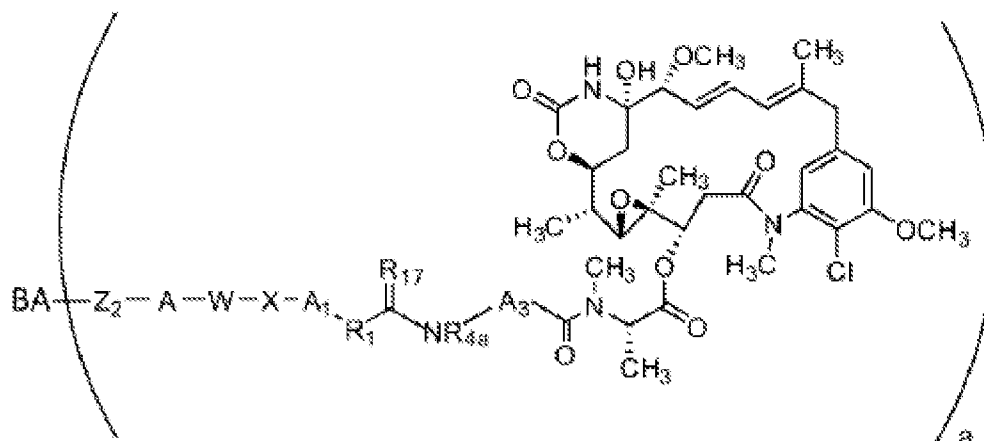
și

De exemplu, compusul cu Formula (II) este:



5

În unele cazuri, maitansinoidul cu Formula (II) este conjugat la un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen prin intermediul unui linker, așa cum se arată în Formula (IIA), mai jos:



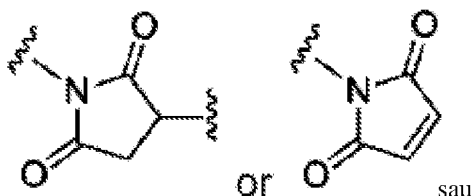
(Formula IIA)

în care:

BA este un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen; a este un număr întreg de la 1 la 30;

Z₂ este reprezentat prin următoarea formulă structurală: -Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}, în care Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} și Z_{2D} sunt fiecare în mod independent absent, un aminoacid, o peptidă având 2-20 aminoacizi, un alchil, un alchinel, un alchenil, un cicloalchil, un aril, un heteroaril, un heterocicil, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-,

-C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄)-, -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,



A este un aminoacid natural sau nenatural sau o peptidă cuprinzând 2-20 aminoacizi; W este -O-, -S-, -CR₅R₆- sau -NR₄-;

X este aril, heteroaril, cicloalchil sau heterocicil, în care aril, heteroaril, cicloalchil și heterocicil sunt opțional substituiți;

în care A₁, A₃ și R₁ sunt fiecare independent un aminoacid, o peptidă având 2-20 aminoacizi, un alchil, un alchinel, un alchenil, un cicloalchil, un aril, un heteroaril, un heterocicil, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-,

-C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -S-C(=S)-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-,

-N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)- sau -O-C(=O)-NR₄-, în care alchil, alchinel, alchenil, cicloalchil, aril, heteroaril și heterocicil sunt opțional substituiți;

R₁₇ este selectat din grupul constând din O, S, NR₁₈ și CR₅R₆;

R₁₈ este selectat din grupul constând din H, alchil, alchinel, alchenil, cicloalchil, aril, heteroaril, heterocicil și acil, în care alchil, alchinel, alchenil, cicloalchil, aril, heteroaril, heterocicil și acil sunt opțional substituiți;

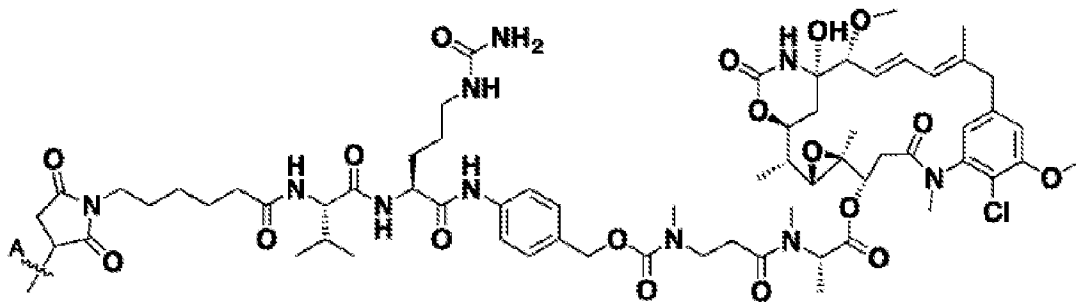
R₄, R₅, R₆ și R₈ sunt fiecare independent H, sau un substituit sau nesubstituit: alchil, alchenil, alchinel, aril, heteroaril sau heterocicil;

R_{4a} este un substituit sau nesubstituit: alchil, alchenil, alchinel, aril, heteroaril sau heterocicil;

p1, p2 și p3 sunt fiecare independent 0, sau un număr întreg de la 1 la 100; și x este 0, 1 sau 2.

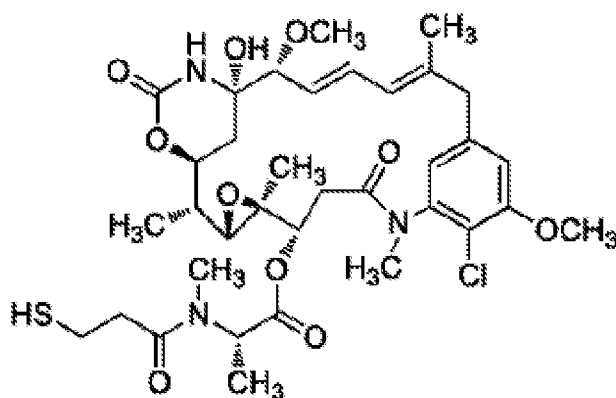
În unele cazuri ale Formulei (IIA), A este o peptidă selectată din grupul constând din valină-citrulină, citrulină-valină, lizină-fenilalanină, fenilalanină-lizină, valină-asparagină, asparagină-valină, treonină-asparagină, asparagină-treonină, serină-asparagină, asparagină-serină, fenilalanină-asparagină, asparagină-fenilalanină, leucină-asparagină, asparagină-leucină, izoleucină-asparagină, asparagină-izoleucină, glicină-asparagină, asparagină-glicină, acid glutamic-asparagină, asparagină, citrulină-asparagină, asparagină-citrulină, alanină-asparagină și asparagină-alanină.

De exemplu, compusul cu Formula (IIA) care este legat de anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia de legare la antigen este:



în care  este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragment al acestuia. În unele cazuri, acest fragment este denumit „Compus 7.”

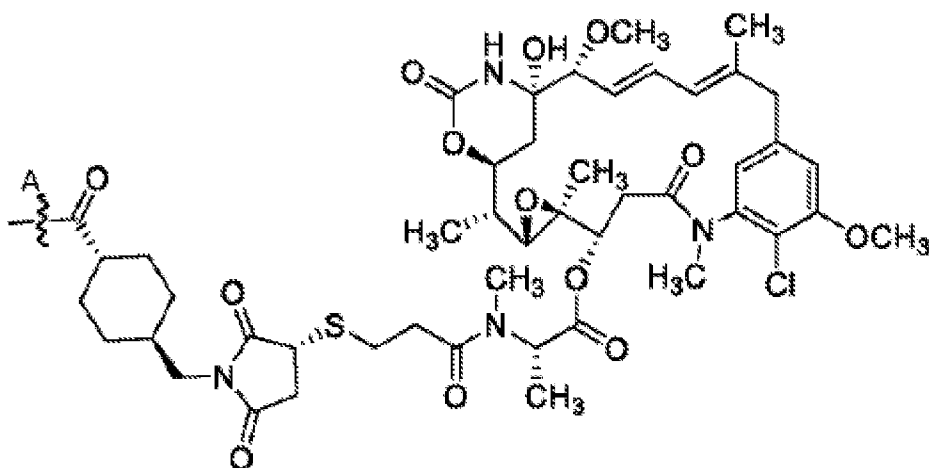
În unele cazuri, agentul citotoxic care este conjugat la un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia este un diastereomer pur sau substanțial pur al DM1:



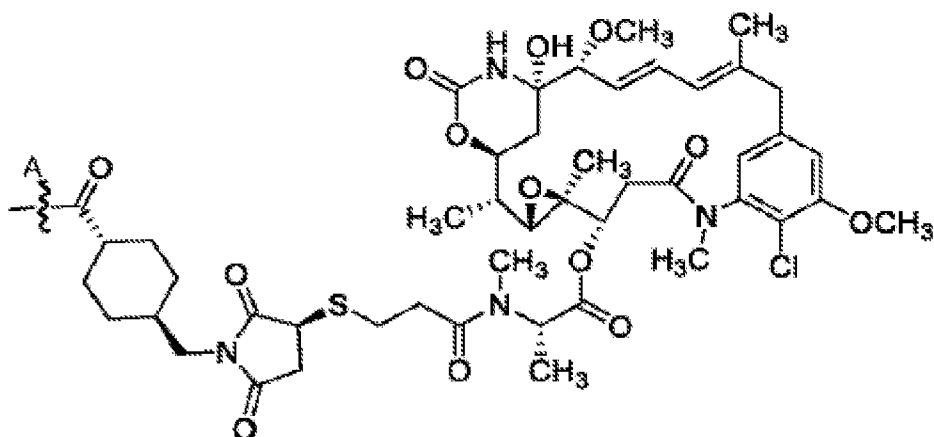
(DM1)

și y este un număr întreg de la 1 la 0.

Într-un alt caz, ADC cuprinde o structură „A-[L-P]_y” în care A este un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen, iar [L-P] este:



sau



sau

- 5 un amestec al acestora și
în care y este un număr întreg de la 1 la 30 și



este o legătură la anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul acestuia.

Alți derivați de maitansinoid sunt discutați în WO 2014/145090, WO2016/160615 și WO 2015/031396.

- 10 În unele cazuri, agentul citotoxic care este conjugat la un anticorp anti-MUC16 sau fragment al acestuia este MMAE sau MMAF.

Alți agenți citotoxici cunoscuți în domeniu sunt luați în considerare în scopul prezentei invenții, incluzând, de exemplu, toxine proteice cum ar fi ricina, toxina *C. difficile*, exotoxina pseudomonas, toxina difterice, toxina botulină, briodina, saporina, toxinele pokeweed (adică, fitolaccatoxină și fitolaccigenina) și altele, cum ar fi cele expuse în Sapra și colab., Pharmacol. & Therapeutics, 2013, 138:452-469.

- 15 Agenții citotoxici („încărcări utile”) pot fi legați de o moleculă de legare a antigenului anti-MUC16 sau de un anticorp printr-un linker chimic care leagă covalent compusul de sarcină utilă la molecula de proteină (adică anticorp). Cazuri ale linkerilor specifici sunt discutate mai sus. Mai general, și așa cum este utilizat aici, termenul "linker" se referă la orice grupare divalentă sau fragment care leagă, conectează sau leagă un agent de legare (de exemplu, un anticorp sau un fragment al acestuia de legare la
- 20 antigen) cu un compus de sarcină utilă prezentat aici. În general, agenți de legare adecvați pentru conjugarea de anticorpi descriși aici sunt cei care sunt suficient de stabili pentru a exploata timpul de înjumătățire în circulație a anticorpului și, în același timp, capabili să-și elibereze sarcina utilă după

internalizarea mediată de antigen a conjugatului. Linkerii pot fi scindabili sau neclivabili. Linkerii clivabili sunt linkeri care sunt scindați prin metabolism intracelular după internalizare, de exemplu, scindare prin hidroliză, reducere sau reacție enzimatică. Linkerii neclivabili sunt linkeri care eliberează o sarcină utilă atașată prin degradarea lizozomală a anticorpului după internalizare. Linkeri adecvați includ, dar fără a se limita la, linkeri labili la acid, linkeri labili la hidroliză, linkeri clivabili enzimatic, linkeri labili de reducere, linkeri auto-imolativi și linkeri neclivabili. Linkerii adecvați îi includ, dar nu se limitează la, pe cei care sunt sau cuprind peptide, glucuronide, succinimid-tioeteri, unități de polietilen glicol (PEG), hidrazone, unități mal-caproil, unități dipeptidice, unități valină-citrulină și para-aminobenzil. (PAB) unități. În unele cazuri, linkerul este capabil să se lege la anticorpul sau fragmentul de legare la antigen printr-un rest de lizină sau un rest de cisteină (de exemplu, prin scindarea unei grupări disulfură a anticorpului sau fragmentului, sau printr-un rest de cisteină introdus în anticorp. sau fragment). În unele cazuri, linkerul este capabil să se lege la anticorp sau fragment printr-un rest de glutamină, inclusiv pe cei derivați prin conjugarea mediată de transglutaminază.

Exemple de linkeri care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții includ linkeri care cuprind sau constau, de exemplu, din MC (6-maleimidocaproil), MCC (maleimidometil ciclohexan-1-carboxilat), MP (maleimidopropanoil), val-cit (valină, citrulină), val-ala (valină-alanină), ala-phe (alanină-fenilalanină), phe-lys (fenilalanină-lizină), situsul dipeptidic în linker clivabil cu protează, PAB (p-aminobenziloxycarbonil), SPP (N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoat), SMCC (N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1 carboxilat), SIAB (N-succinimidil (4-iodo-acetil)aminobenzoat) și variante și combinații ale acestora. Exemple suplimentare de linkeri care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții sunt dezvăluite, de exemplu, în brevetul US nr. Nr. 7,754,681 și în Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 21:5-13, și referințele citate aici. În unele cazuri, linkerul este sau conține un distanțier auto-imolativ, cum ar fi cele discutate în Jin, și colab., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20:3465-3469, și Wu, și colab., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24:2697-2706.

Sarcinile utile pot fi legate de anticorpul anti-MUC16 sau fragmentul de legare a antigenului printr-o atașare la un anumit aminoacid din anticorpul sau molecula de legare a antigenului. Exemple de atașamente de aminoacizi care pot fi utilizate în contextul acestui aspect al invenției includ, de exemplu, lizina (vezi, de exemplu, brevetul US nr. 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander și colab., Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; Brevetul U.S. Nr. 5,714,586; US 2013/0101546; și US 2012/0585592), cisteină (a se vedea, de exemplu, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/ 130598, US 2013/0101546, și brevetul U.S. 7,750,116), selenocisteină (vezi, de exemplu, WO 2008/122039; și Hofer și colab., Proc. Natl.

Acad. Sci., USA, 2008, 105:12451-12456), formil glicină (vezi, de exemplu, Carrico și colab., Nat. Chim. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal și colab., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110:46-51, și Rabuka și colab., Nat. Protocols, 2012, 10: 1052-1067), aminoacizi nenaturali (vezi, de exemplu, WO 2013/068874 și WO 2012/166559) și aminoacizi acizi (vezi, de exemplu, WO 2002/05982). Linkerii pot fi, de asemenea, conjugați la o proteină care leagă antigenul prin atașarea la carbohidrați (vezi, de exemplu, US 2008/0305497 și Ryan și colab., Food & Agriculture Immunol., 2001, 13: 127-130) și linkeri disulfuri (vezi, de exemplu, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 și Shaunak și colab., Nat. Chim. Biol., 2006, 2:312-313).

Raportul medicament-anticorp (DAR) este numărul mediu de medicamente conjugate la anticorpul sau fragmentul de legare la antigen, care are un efect important asupra eficacității, potenței și farmacocinetica ADC. În diferite cazuri, DAR este de la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sau 8 molecule de medicament per anticorp. În unele cazuri, DAR este de la 1 la 4. În anumite cazuri, DAR este de la 2 la 4. În unele cazuri, DAR este de la 2 la 3. În anumite cazuri, DAR este de la 3 la 4. În unele realizări, DAR este de la 1 la 10, de la 1 la 20 sau de la 1 la 30 (adică de la 1 la 30 de molecule de medicament per anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia).

Formulare și administrare terapeutică

Prezenta dezvăluire furnizează compoziții farmaceutice care cuprind moleculele de legare la antigen ale prezentei dezvăluiri. Compozițiile farmaceutice sunt formulate cu purtători adecvați, excipienți și alți agenți care asigură transfer, livrare, toleranță și altele asemenea îmbunătățite. O multitudine de formulări adecvate pot fi găsite în formularul cunoscut de toți chimiștii farmaceutici: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Aceste formulări includ, de exemplu, pulberi, paste, unguente, jeleuri, ceară, uleiuri, lipide, vezicule care conțin lipide (cationice sau anionice) (cum ar fi LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugați ADN, paste de absorbție anhidre, emulsii ulei-în-apă și apă-în-ulei, emulsii carbowax (polietilenglicoli de diferite greutatea moleculare), geluri semi-solide și semi-solide. amestecuri solide care conțin carbowax. Vezi, de

asemenea, Powell et al. "Compendiu de excipienți pentru formulări parenterale" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Doza de moleculă de legare a antigenului administrată unui pacient poate varia în funcție de vârsta și mărimea pacientului, boala țintă, condițiile, calea de administrare și altele asemenea. Doza preferată este de obicei calculată în funcție de greutatea corporală sau suprafața corpului. Când o moleculă bispecifică de legare a antigenului este utilizată în scopuri terapeutice la un pacient adult, poate fi avantajos administrarea intravenoasă a moleculei bispecifice de legare a antigenului din prezenta invenție, în mod normal, la o singură doză de aproximativ 0,01 până la aproximativ 20 mg. /kg greutate corporală, mai preferabil aproximativ 0,02 până la aproximativ 7, aproximativ 0,03 până la aproximativ 5, sau aproximativ 0,05 până la aproximativ 3 mg/kg greutate corporală. În funcție de severitatea afecțiunii, frecvența și durata tratamentului pot fi ajustate. Dozele și programele eficiente pentru administrarea unei molecule bispecifice de legare a antigenului pot fi determinate empiric; de exemplu, progresul pacientului poate fi monitorizat prin evaluare periodică, iar doza ajustată în consecință. Mai mult, scalarea interspecie a dozelor poate fi realizată utilizând metode binecunoscute în domeniu {de exemplu, Mordenti și colab., 1991, Pharmaceut. Res. 8: 1351).

Sunt cunoscute diferite sisteme de livrare și pot fi utilizate pentru a administra compoziția farmaceutică, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime virusurile mutante, endocitoza mediata de receptor (vezi, de exemplu, Wu și colab., 1987, J. Biol. Chim.

262:4429-4432). Metodele de introducere includ, dar nu se limitează la, căile intradermice, intramusculare, intraperitoneale, intravenoase, subcutanate, intranazale, epidurale și orale. Compoziția poate fi administrată pe orice cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injectare în bolus, prin absorbție prin căptușeli epiteliale sau mucocutanate (de exemplu, mucoasa bucală, mucoasa rectală și intestinală, etc.) și poate fi administrată împreună cu alți agenți biologic activi. Administrarea poate fi sistemică sau locală.

O compoziție farmaceutică poate fi administrată subcutanat sau intravenos cu un ac standard și o seringă. În plus, în ceea ce privește administrarea subcutanată, un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) are aplicații în eliberarea unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Un astfel de dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) poate fi reutilizabil sau de unică folosință. Un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) reutilizabil utilizează în general un cartuș înlocuibil care conține o compoziție farmaceutică. Odată ce toată compoziția farmaceutică din cartuș a fost administrat și cartușul este gol, cartușul gol poate fi aruncat cu ușurință și înlocuit cu un cartuș nou care conține compoziția farmaceutică. Dispozitivul de livrare a stiloului poate fi apoi reutilizat. Într-un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință, nu există un cartuș înlocuibil. Mai degrabă, dispozitivul de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință vine pre-umplut cu compoziția farmaceutică menținută într-un rezervor în interiorul dispozitivului. Odată ce rezervorul este golit de compoziția farmaceutică, întregul dispozitiv este aruncat.

Numeroase dispozitive de eliberare a stiloului injector (pen) și autoinjector reutilizabile au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Exemplele includ, dar nu se limitează la, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Marea Britanie), stiloul injector (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Elveția), stiloul stilou HUMALOG MIX 75/25™, Pix HUMALOG™, stilou HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II și III (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), stilou BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ și OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germania), pentru a numi doar câteva. Exemple de dispozitive de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință care au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice includ, dar nu se limitează la, stiloul injector (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) și KWIKPEN™ (Eli. Lilly), autoinjectorul SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germania), EPIPEN (Dey, L.P.) și stiloul HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), pentru numiți doar câteva.

În anumite situații, compoziția farmaceutică poate fi eliberată într-un sistem de eliberare controlată. De exemplu, poate fi utilizată o pompă (vezi Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. ing. 14:201). Într-un alt exemplu, pot fi utilizate materiale polimerice; vezi, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Într-un alt exemplu, un sistem cu eliberare controlată poate fi plasat în apropierea țintei compoziției, necesitând astfel doar o fracțiune din doza sistemică (vezi, de exemplu, Goodson, 1984, în Medical Applications of Controlled Release, supra, voi. 2, pp. 115-138). Alte sisteme de eliberare controlată sunt discutate în recenzia lui Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Preparatele injectabile pot include forme de dozare pentru injecții intravenoase, subcutanate, intracutanate și intramusculare, perfuzii prin picurare etc.

Aceste preparate injectabile pot fi preparate prin metode cunoscute public. De exemplu, preparatele injectabile pot fi preparate, de exemplu, prin dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea anticorpului sau a sării sale descrise mai sus într-un mediu apos steril sau într-un mediu uleios utilizat în mod convențional pentru injecții. Ca mediu apos pentru injecții, există, de exemplu, soluție salină fiziologică, o soluție izotonă care conține glucoză și alți agenți auxiliari, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare adecvat, cum ar fi un alcool (de exemplu, etanol), un polialcool (de exemplu, propilen glicol, polietilen glicol), un surfactant neionic [de exemplu, polisorbit 80, HCO-50 (aduct polioxietilen (50 mol) de ulei de ricin hidrogenat)] etc. Ca mediu uleios, se folosesc, de exemplu, ulei de susan, ulei de soia, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare cum ar fi benzoat de benzil, alcool benzilic etc. Injecția astfel preparată este de preferință umplută într-o fiolă adecvată.

În mod avantajos, compozițiile farmaceutice pentru utilizare orală sau parenterală descrise mai sus sunt preparate în forme de dozare într-o doză unitară potrivită pentru a se potrivi unei doze de ingrediente active. Astfel de forme de dozare într-o doză unitară includ, de exemplu, tablete, pastile, capsule, injecții (fiole), supozitoare etc. Cantitatea de anticorp menționat mai sus conținută este în general de aproximativ 5 până la aproximativ 500 mg per formă de dozare într-o doză unitară; în special sub formă de injecție, este de preferat ca anticorpul menționat mai sus să fie conținut în aproximativ 5 până la aproximativ 100 mg și în aproximativ 10 până la aproximativ 250 mg pentru celelalte forme de dozare.

Utilizări terapeutice ale moleculelor de legare a antigenului

Prezenta dezvoltare include metode care cuprind administrarea unui subiect care are nevoie de aceasta a unei compoziții terapeutice cuprinzând un anticorp anti-MUC16 sau un fragment al acestuia de legare la antigen, sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 și MUC16. Compoziția terapeutică poate cuprinde oricare dintre anticorpii sau moleculele bispecifice de legare a antigenului așa cum sunt dezvoltate aici și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic. Așa cum este utilizată aici, expresia „un subiect care are nevoie de aceasta” înseamnă un animal uman sau non-uman care prezintă unul sau mai multe simptome sau indicii de cancer (de exemplu, un subiect care exprimă o tumoră sau care suferă de oricare dintre tipurile de cancer menționate mai jos), sau care altfel ar beneficia de o inhibare sau o reducere a activității MUC16 sau o epuizare a celulelor MUC16+ (de exemplu, celulele cancerului ovarian). Cu toate acestea, metodele de tratament terapeutic nu fac parte din metoda revendicată.

Anticorpii și moleculele bispecifice de legare la antigen ale invenției (și compozițiile terapeutice care le cuprind) sunt utile, inter alia, pentru tratarea oricărei boli sau tulburări în care stimularea, activarea și/sau țintirea unui răspuns imun ar fi benefică. În special, anticorpii anti-MUC16 sau moleculele bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 din prezenta invenție pot fi utilizați pentru tratamentul, prevenirea și/sau ameliorarea oricărei boli sau tulburări asociate sau mediate de expresia MUC16, sau activitatea sau proliferarea celulelor MUC16+. Mecanismul de acțiune prin care sunt realizate metodele terapeutice ale invenției includuciderea celulelor care exprimă MUC16 în prezența celulelor efectoare, de exemplu, prin CDC, apoptoză, ADCC, fagocitoză sau printr-o combinație a două sau mai multe dintre acestea, mecanisme. Celulele care exprimă MUC16 care pot fi inhibitate sau distruse utilizând moleculele bispecifice de legare a antigenului din invenție includ, de exemplu, celule de cancer ovarian.

Moleculele de legare a antigenului din prezenta invenție pot fi utilizate pentru a trata o boală sau o tulburare asociată cu expresia MUC16 incluzând, de exemplu, un cancer care include cancer ovarian, cancer de sân, cancer pancreatic, cancer pulmonar fără celule mici, colangiocarcinom intrahepatic, tip de formare, adenocarcinom al colului uterin și adenocarcinom al tractului gastric. Conform anumitor cazuri, anticorpii anti-MUC16 sau anticorpii bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 sunt utili pentru tratarea unei paciente afectate de cancer ovarian. Conform altor cazuri înrudite ale invenției, sunt furnizate metode care cuprind administrarea unui anticorp anti-MUC16 sau a unei molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 așa cum este dezvoltat aici la o pacientă care este afectată de cancer ovarian. Metodele analitice/diagnostic cunoscute în domeniu, cum ar fi scanarea tumorii, etc., pot fi utilizate pentru a stabili dacă o pacientă prezintă o tumoră ovariană.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, metode pentru tratarea cancerului rezidual la un subiect. Așa cum este utilizat aici, termenul "cancer rezidual" înseamnă existența sau persistența uneia sau mai multor celule canceroase la un subiect în urma tratamentului cu o terapie anticancer.

Conform anumitor aspecte, prezenta dezvoltare furnizează metode pentru tratarea unei boli sau tulburări asociate cu expresia MUC16 (de exemplu, cancer ovarian) care cuprind administrarea uneia sau

mai multor molecule anti-MUC16 sau bispecifice de legare a antigenului descrise în altă parte aici unui subiect după s-a stabilit că subiectul are cancer de prostată. De exemplu, prezenta dezvoltare include metode pentru tratarea cancerului ovarian care cuprind administrarea unui anticorp anti-MUC16 sau a unei molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-MUC16 la o pacientă 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni sau 4 săptămâni, 2 luni, 4 luni, 6 luni, 8 luni, 1 an sau mai mult după ce subiectul a primit terapie hormonală (de exemplu, terapie anti-androgenă).

Terapii și formulări combinate

Prezenta dezvoltare furnizează metode care cuprind administrarea unei compoziții farmaceutice cuprinzând oricare dintre anticorpii exemplari și moleculele bispecifice de legare a antigenului descrise aici în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari. Exemple de agenți terapeutici suplimentari care pot fi combinați cu sau administrați în combinație cu o moleculă de legare a antigenului din prezenta invenție includ, de exemplu, un antagonist EGFR (de exemplu, un anticorp anti-EGFR [de exemplu, cetuximab sau panitumumab] sau inhibitor cu moleculă mică de EGFR [de exemplu, gefitinib sau erlotinib]), un antagonist al unui alt membru al familiei EGFR, cum ar fi Her2/ErbB2, ErbB3 sau ErbB4 (de exemplu, anticorp anti-ErbB2, anti-ErbB3 sau anti-ErbB4 sau inhibitor cu molecule mici de ErbB2, ErbB3 sau activitate ErbB4), un antagonist al EGFRvIII (de exemplu, un anticorp care se leagă în mod specific EGFRvIII), un antagonist cMET (de exemplu, un anticorp anti-cMET), un antagonist IGF1 R (de exemplu, un anticorp anti-IGF1 R), a inhibitor B-raf (de exemplu, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibitor PDGFR- α (de exemplu, un anticorp anti-PDGFR- α), un inhibitor PDGFR- β (de exemplu, un anticorp anti-PDGFR- β), un antagonist VEGF (de exemplu, un VEGF-capcană, vezi, de exemplu, US 7,087,411 (denumită aici și „proteină de fuziune care inhibă VEGF”), anticorp anti-VEGF (de exemplu, bevacizumab), un inhibitor de kinază cu moleculă mică al receptorului VEGF (de exemplu, sunitinib, sorafenib sau pazopanib)), un antagonist DLL4 (de exemplu, un anticorp anti-DLL4 dezvoltat în US 2009/0142354, cum ar fi REGN421), un antagonist Ang2 (de ex. Anticorpul Ang2 dezvoltat în US 2011/0027286, cum ar fi H1H685P), un antagonist FOLH1 (PSMA), un antagonist PRLR (de exemplu, un anticorp anti-PRLR), un antagonist STEAP1 sau STEAP2 (de exemplu, un anticorp anti-STEAP1 sau un anticorp anti-STEAP2), un antagonist TMRSS2 (de exemplu, un anticorp anti-TMRSS2), un antagonist MSLN (de exemplu, un anticorp anti-MSLN), un antagonist CA9 (de exemplu, un anticorp anti-CA9), un antagonist de uroplakină (de exemplu, un anticorp anti-uroplakină), etc. Alți agenți care pot fi administrați în mod benefic în combinație cu moleculele de legare a antigenului includ inhibitori de citokine, inclusiv inhibitori de citokine cu molecule mici și anticorpi care se leagă la citokine cum ar fi 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 sau la receptorii lor respectivi. Compozițiile farmaceutice (de exemplu, compozițiile farmaceutice care cuprind o moleculă bispecifică de legare la antigen anti-CD3/anti-MUC16 așa cum este dezvoltată aici) pot fi, de asemenea, administrate ca parte a unui regim terapeutic care cuprinde una sau mai multe combinații terapeutice selectate dintre „ICE”: ifosfamidă (de exemplu, Ifex®), carboplatină {de exemplu, Paraplatin®}, etoposidă {de exemplu, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16}; „DHAP”: dexametazonă {de exemplu, Decadron®}, citarabină {de exemplu, Cytosar-U®, citozin arabinozidă, ara-C}, cisplatină {de exemplu, Platinol®-AQ}; și „ESHAP”: etoposidă {de exemplu, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16}, metilprednisolon {de exemplu, Medrol®}, citarabină în doză mare, cisplatină {de exemplu, Platinol®-AQ}.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, combinații terapeutice care cuprind oricare dintre moleculele de legare la antigen menționate aici și un inhibitor al unuia sau mai multor dintre VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMRSS2, MSLN, CA9, uroplakină sau oricare dintre citokinele menționate mai sus, în care inhibitorul este un aptamer, o moleculă antisens, o ribozimă, un siARN, un peptidocorp, un nanocorp sau un fragment de anticorp {de exemplu, fragment Fab; fragmenF(ab')₂; fragment Fd; fragment Fv; scFv; fragment dAb; sau alte molecule modificate, cum ar fi diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi și unități minime de recunoaștere}. Moleculele de legare la antigen ale invenției pot fi, de asemenea, administrate și/sau co-formulate în combinație cu antivirale, antibiotice, analgezice, corticosteroizi și/sau NSAID-uri. Moleculele de legare la antigen ale invenției pot fi, de asemenea, administrate ca parte a unui regim de tratament care include, de asemenea, tratament cu radiații și/sau chimioterapie convențională.

Componentele active terapeutic suplimentare pot fi administrate chiar înainte de, concomitent cu sau la scurt timp după administrarea unei molecule de legare a antigenului din prezenta invenție; (în scopul prezentei dezvoltări, astfel de regimuri de administrare sunt considerate administrarea unei molecule de legare la antigen „în combinație cu” o componentă suplimentară activă terapeutic).

Prezenta dezvoltare include compoziții farmaceutice în care o moleculă de legare a antigenului a prezentei invenții este co-formulată cu una sau mai multe dintre componentele suplimentare activ(e) terapeutică așa cum este descris în altă parte aici.

5 **Regimuri de administrare**

Conform anumitor cazuri, doze multiple de o moleculă de legare a antigenului (de exemplu, un anticorp anti-MUC16 sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16 și CD3) pot fi administrate unui subiect pe o perioadă de timp definită. Metodele conform acestui aspect al invenției cuprind administrarea secvențială la un subiect de doze multiple dintr-o moleculă de legare a antigenului conform invenției. Așa cum este folosit aici, "administrare secvențială" înseamnă că fiecare doză dintr-o moleculă de legare a antigenului este administrată subiectului la un moment diferit de timp, de exemplu, în zile diferite separate printr-un interval predeterminat {de exemplu, ore, zile, săptămâni sau luni}. Prezenta dezvoltare include metode care cuprind administrarea secvențială la pacient a unei singure doze inițiale dintr-o moleculă de legare a antigenului, urmată de una sau mai multe doze secundare ale moleculei de legare a antigenului și, opțional, urmată de una sau mai multe doze terțiare de antigen, moleculă de legare.

Termenii "doză inițială", "doze secundare" și "doze terțiare" se referă la secvența temporală de administrare a moleculei de legare a antigenului conform invenției. Astfel, "doza inițială" este doza care este administrată la începutul regimului de tratament (denumită și "doză de bază"); "dozele secundare" sunt dozele care sunt administrate după doza inițială; iar "dozele terțiare" sunt dozele care sunt administrate după dozele secundare. Dozele inițiale, secundare și terțiare pot conține toate aceeași cantitate de moleculă de legare a antigenului, dar în general pot diferi una de cealaltă în ceea ce privește frecvența administrării. În anumite cazuri, totuși, cantitatea de moleculă de legare a antigenului conținută în dozele inițiale, secundare și/sau terțiare variază una de la alta (de exemplu, ajustată în sus sau în jos după caz) în timpul tratamentului. În anumite cazuri, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4 sau 5) doze sunt administrate la începutul regimului de tratament ca „doze de încărcare” urmate de doze ulterioare care sunt administrate mai puțin frecvent (de exemplu, „doze de întreținere”).

Într-un caz exemplificativ, fiecare doză secundară și/sau terțiară este administrată de la 1 la 26 (de exemplu, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ sau mai mult) săptămâni după doza imediat anterioară. Expresia "doza imediat anterioară", așa cum este utilizată aici, înseamnă, într-o secvență de administrări multiple, doza de moleculă de legare a antigenului care este administrată unui pacient înainte de administrarea dozei următoare în secvența fără intervenție, doze.

Metodele conform acestui aspect pot cuprinde administrarea unui pacient a oricărui număr de doze secundare și/sau terțiare ale unei molecule de legare la antigen (de exemplu, un anticorp anti-MUC16 sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific MUC16 și CD3). De exemplu, în anumite variante de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză secundară.

În alte variante de realizare, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare sunt administrate pacientului. De asemenea, în anumite cazuri, pacientului i se administrează doar o singură doză terțiară. În alte cazuri, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului.

În cazurile care implică doze secundare multiple, fiecare doză secundară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze secundare. De exemplu, fiecare doză secundară poate fi administrată pacientului la 1 până la 2 săptămâni după doza imediat anterioară. În mod similar, în exemplele de realizare care implică mai multe doze terțiare, fiecare doză terțiară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze terțiare. De exemplu, fiecare doză terțiară poate fi administrată pacientului la 2 până la 4 săptămâni după doza imediat anterioară. Alternativ, frecvența la care dozele secundare și/sau terțiare sunt administrate unui pacient poate varia pe parcursul regimului de tratament. Frecvența de administrare poate fi, de asemenea, ajustată în timpul tratamentului de către un medic, în funcție de nevoile pacientului în parte după examenul clinic.

Utilizări pentru diagnosticare ale anticorpilor

Anticorpii anti-MUC16 pot fi, de asemenea, utilizați pentru a detecta și/sau măsura celulele MUC16 sau care exprimă MUC16 într-o probă, de exemplu, o probă biologică în scopuri de diagnosticare. De exemplu, un anticorp anti-MUC16, sau fragment al acestuia, poate fi utilizat pentru a diagnostica o afecțiune sau o boală caracterizată prin exprimare aberantă (de exemplu, supraexpresie, subexpresie, lipsă de expresie etc.) a MUC16. Testele de diagnostic exemplificative pentru MUC16 pot

cuprinde, de exemplu, punerea în contact a unei probe, obținută de la un pacient, cu un anticorp anti-MUC16, în care anticorpul anti-MUC16 este marcat cu o moleculă marcatoare sau reporter detectabilă. Alternativ, un anticorp anti-MUC16 nemarcat poate fi utilizat în aplicații de diagnostic în combinație cu un anticorp secundar care este el însuși marcat detectabil. Marcatorul detectabil sau molecula raportor poate fi un radioizotop, cum ar fi ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S sau ^{251}I ; un fragment fluorescent sau chemiluminiscent, cum ar fi izotiocianat de fluoresceină sau rodamină; sau o enzimă cum ar fi fosfatază alcalină, beta-galactozidază, peroxidază de hrean sau luciferază. O altă utilizare exemplificativă de diagnosticare a anticorpilor anti-MUC16 include anticorpi marcați cu ^{89}Zr , cum ar fi marcați cu ^{89}Zr -desferioxamină, în scopul identificării neinvazive și urmăririi celulelor tumorale la un subiect (de exemplu, imagistica cu tomografie cu emisie de pozitroni (PET)). (A se vedea, de exemplu, Tavare, R. et al. Cancer Res. 2016 1 ian;76(1):73-82; și Azad, BB. et al. Oncotarget. 2016 Mar 15;7(1 1):12344-58). Testele exemplificative specifice care pot fi utilizate pentru a detecta sau măsura MUC16 într-o probă includ testul imunosorbent legat de enzime (ELISA), radioimunotestul (RIA) și sortarea celulelor activate de fluorescență (FACS).

Probele care pot fi utilizate în testele de diagnosticare MUC16 includ orice probă de țesut sau fluid obținută de la un pacient care conține cantități detectabile de proteină MUC16, sau fragmente ale acesteia, în condiții normale sau patologice. În general, nivelurile de MUC16 dintr-o probă specială obținută de la un pacient sănătos (de exemplu, un pacient care nu suferă de o boală sau afecțiune asociată cu niveluri sau activitate anormală de MUC16) vor fi măsurate pentru a stabili inițial un nivel de referință sau standard al MUC16. Acest nivel de bază al MUC16 poate fi apoi comparat cu nivelurile de MUC16 măsurate în probe obținute de la indivizi suspectați de a avea o boală legată de MUC16 (de exemplu, o tumoare care conține celule care exprimă MUC16) sau o afecțiune. Exemple de probe de țesut sau fluid includ, dar nu se limitează la acestea, plasmă, ser, ascită, ovar, uter, col uterin, ficat, vezică urinară, pancreas, stomac, intestin subțire sau gros, vezică biliară, sân, plămân, rinichi, salivare și glandele lacrimale sau orice malignitate epitelioasă a acestora. Exemple suplimentare de probe de țesut sau fluid includ, dar nu se limitează la carcinomul seros papilar al colului uterin, adenocarcinomul endometrului, adenocarcinomul cu celule clare al vezicii urinare, carcinomul veziculelor seminale, carcinomul gastric, adenocarcinomul colorectal și mezoteliomul epitelioasă. Se prevede că orice probă de fluid sau de țesut care conține cantități detectabile de proteină MUC16, sau fragmente ale acesteia, poate fi supusă metodelor de detectare descrise aici. Metodele descrise pot fi utilizate pentru a monitoriza dezvoltarea și progresia bolilor maligne sau pentru a distinge între condiții normale și boli. Ca atare, metodele descrise pot fi utilizate pentru a detecta sau monitoriza cancerul, cum ar fi cancerul ovarian, cancerul vezicii urinare, cancerul mamar, cancerul pancreatic, cancerul pulmonar fără celule mici, tipul colangiocarcinomului intrahepatic care formează masa, adenocarcinomul colului uterin, și adenocarcinom al tractului gastric.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt prezentate astfel încât să ofere celor cu calificare obișnuită în domeniu o dezvoltare și o descriere completă a modului de realizare și utilizare a metodelor și compozițiilor invenției și nu au scopul de a limita domeniul de aplicare a ceea ce consideră inventatorii ca invenția lor. S-au făcut eforturi pentru a asigura acuratețea cu privire la numerele utilizate (de exemplu, cantități, temperatură etc.), dar ar trebui luate în considerare unele erori și abateri experimentale. Dacă nu se indică altfel, părțile sunt părți în greutate, greutatea moleculară este greutatea moleculară medie, temperatura este în grade Centigrade și presiunea este la sau aproape de atmosferă.

Exemplul 1: Generarea de anticorpi anti-MUC16

Anticorpii anti-MUC16 au fost obținuți prin imunizarea unui șoarece modificat genetic cu un antigen MUC16 uman sau prin imunizarea unui șoarece modificat cuprinzând ADN care codifică regiuni variabile ale lanțului greu de imunoglobulină umană și lanț ușor kappa cu un antigen MUC16 uman.

Șoarecii modificați genetic au fost imunizați cu hMUC16.nub (un format trunchiat care cuprinde ultimele cinci domenii SEA ale Mucin-16 (SEQ ID: 1902)) sau imunizați cu o linie celulară care exprimă hMUC16, cum ar fi celulele OVCAR-3.

SEQ ID No: 1902 conține resturile 13810-14451 ale SEQ ID NO: 1899, precum și etichete C-terminale. După imunizare, splenocitele au fost recoltate de la fiecare șoarece și fie (1) fuzionează cu celule de mielom de șoarece pentru a-și păstra viabilitatea și forma celule de hibridom și analizate pentru specificitatea MUC16, fie (2) celule B sortate (așa cum este descris în US 2007/0280945A1) folosind un fragment uman MUC16 ca reactiv de sortare care se leagă și identifică anticorpii reactivi (celule B pozitive pentru antigen).

Anticorpii himerici la MUC16 au fost inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii au fost caracterizați și selectați pentru caracteristici dezirabile, inclusiv

afinitatea, selectivitatea etc. Dacă este necesar, regiunile constante de șoarece au fost înlocuite cu o regiune constantă umană dorită, de exemplu regiunea constantă IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificată, pentru a genera un anticorp anti-MUC16 complet uman. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate mare și specificitate țintă rezidă în regiunea variabilă. Denumirile anticorpilor, cum ar fi H1H8755P și H1M7129N, denotă anticorpi complet umani „H1H” sau anticorpi himeric uman variabil/regiune constantă de șoarece „H1M”. Anticorpii identificați prin metoda hibridomului sunt indicați cu numere ID anticorpi care se termină cu „N” sau „N2”. Anticorpii identificați prin metoda de sortare a celulelor B sunt indicați cu numere de identificare a anticorpilor care se termină cu „P” sau „P2”.

Anumite proprietăți biologice ale anticorpilor exemplificativi anti-MUC16 generați în conformitate cu metodele din acest Exemplu sunt descrise în detaliu în Exemplele prezentate mai jos.

Secvențele de aminoacizi și acizi nucleici din regiunea variabilă a lanțului greu și ușor ale anticorpilor anti-MUC16

Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor și CDR-urile anticorpilor anti-MUC16 selectați. Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 2.

Tabelul 1: Identificatori de secvență de aminoacizi

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H8767P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H8770P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H8783P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H8790P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H8794P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H8794P2	82	84	86	88	858	860	862	864
H1H8799P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H8799P2	98	100	102	104	170	172	174	176
H1H8804P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H8808P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H8810P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H8813P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1M7129N	178	180	182	184	186	188	190	192
H1M7137N	194	196	198	200	394	396	398	400
H1M9519N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M9521N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M9528N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M7128N	250	252	254	256	1936	1938	1940	1942
H1M7130N	1944	1946	1948	1950	1952	1954	1956	1958
H2M7131N	258	260	262	264	266	268	270	272
H2M7133N	274	276	278	280	1936	1938	1940	1942
H2M7134N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M7135N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M7138N	314	316	318	320	322	324	326	328

H2M9538N	330	332	334	336	338	340	342	344
H3M9524N	346	348	350	352	354	356	358	360
H3M9525N	362	364	366	368	370	372	374	376
H3M9529N	378	380	382	384	386	388	390	392

Tabelul 2: Identificatori de secvență de acid nucleic

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H8767P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H8770P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H8783P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H8790P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H8794P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H8794P2	81	83	85	87	857	859	861	863
H1H8799P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H8799P2	97	99	101	103	169	171	173	175
H1H8804P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H8808P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H8810P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H8813P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1M7129N	177	179	181	183	185	187	189	191
H1M7137N	193	195	197	199	393	395	397	399
H1M9519N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M9521N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M9528N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M7128N	249	251	253	255	1935	1937	1939	1941
H1M7130N	1943	1945	1947	1949	1951	1953	1955	1957
H2M7131N	257	259	261	263	265	267	269	271
H2M7133N	273	275	277	279	1935	1937	1939	1941
H2M7134N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M7135N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M7138N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M9538N	329	331	333	335	337	339	341	343
H3M9524N	345	347	349	351	353	355	357	359
H3M9525N	361	363	365	367	369	371	373	375
H3M9529N	377	379	381	383	385	387	389	391

Exemplul 2: Anticorpul anti-MUC16 se leagă în mod specific la hMUC16 exprimat endogen pe linia celulară OVCAR-3

Capacitatea anticorpilor anti-MUC16 de a se lega în mod specific de MUC16 care exprimă endogen pe linia celulară de carcinom ovarian uman (OVCAR-3) a fost evaluată printr-un test de detecție

bazat pe electrochimiluminiscență (Meso Scale Discovery (MSD), Rockville, MD). Pe scurt, OVCAR-3 și o linie celulară de adenocarcinom ovarian martor, SK-OV-3, care nu are o expresie detectabilă a hMUC16, au fost clătite în 1xPBS suplimentat cu $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) urmată de incubare în tampon de disociere celulară fără enzime (Millipore, Billerica, MA) timp de 10 minute la 37°C. Celulele detașate au fost apoi spălate o dată în 1xPBS suplimentat cu $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ și numărate (Cellometer Auto T4 cell counter, Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Aproximativ $1,0 \times 10^4$ celule au fost placate în plăci cu electrozi de carbon cu 96 de godeuri (MSD) MULTI-ARRAY și incubate timp de 1 oră la 37°C. Siturile de legare nespecifice au fost apoi blocate cu 2% BSA (g/v) în PBS timp de 1 oră la temperatura camerei. Apoi, la celulele legate de placă au fost adăugate diluții în serie de anticorpi anti-MUC16 sau de control (0,85pM -50nM) și martori tampon fără anticorpi au fost adăugați la celulele legate de placă și incubate timp de 1 oră la temperatura camerei (RT). Plăcile au fost apoi spălate pentru a îndepărta anticorpul nelegat utilizând un dispozitiv de spălat plăci AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Anticorpul legat de plăci au fost detectați cu un anticorp anti-lanț ușor kappa uman conjugat cu SULFO-TAG™ (Regeneron) sau cu un anticorp IgG anti-șoarece conjugat cu SULFO-TAG™ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) timp de 1 oră la RT. După spălare, plăcile au fost dezvoltate cu Read Buffer (MSD) conform protocolului producătorului și semnalele luminescente au fost înregistrate cu un instrument SECTOR Imager 6000 (MSD).

Intensitatea luminiscentei, măsurată în unități de lumină relativă (RLU), pentru cele două linii celulare a fost înregistrată pentru a indica intensitatea de legare a fiecărui anticorp. Raportul semnalului detectat cu legarea anticorpului anti-MUC16 de 1,9 nM sau 16,7 nM la OVCAR-3 vs. SK-OV-3 a fost raportat ca o indicație a specificității și potenței de legare (Tabelul 3).

Tabelul 3: Raporturile de legare celulară ale anticorpilor anti-Muc 6 care exprimă endogen hMUC16 OVCAR-3 față de liniile celulare SK-OV-3 hMUC16-negative

Raport: anti-MUC16 Legare OVCAR-3/SK-OV-3		
ID Anticorp	[Ab]: 1.9nM	[Ab]: 16.7nM
Anticorpi Anti-Muc16 Hibridom (H1M, H2M, H3M)		
H2M7128N	59	31
H1M7129N	68	19
H2M7131N	86	37
H2M7133N	69	33
H2M7134N	68	29
H2M7135N	30	5
H1M7137N	77	29
H2M7138N	82	50
H3M7132N	89	38
H1M9519N	109	78
H1M9521N	132	107
H3M9524N	81	57
H3M9525N	137	51
H1M9528N	153	120
H3M9529N	143	99
H2M9538N	89	26
Anticorpi umani Fc anti-MUC16 (H1H)		
H1H8755P	13	5
H1H8767P	4	NS
H1H8770P	9	3
H1H8783P	11	4

H1H8790P	8	3
H1H8794P	8	3
H1H8794P2	5	NS
H1H8799P	10	4
H1H8799P2	10	4
H1H8804P	8	3
H1H8808P	4	NS
H1H8810P	8	3
H1H8813P	11	5
H1H9519N	41	30
H1H9521N	30	28
H1H9524N	20	48
H1H9525N	4	21
H1H9528N	41	18
H1H9529N	109	74
H1H9538N	12	13
Controale		
mIgG1 Anticorp de control al izo- tipului	NS	NS
mIgG2a Anticorp de control al izo- tipului	NS	NS
hIgG1 Anticorp de control al izotipului	NS	NS
NS=nespecific - raport la 1,9 nM sau 16,7 nM <2,5 ori. Izotipuri: H1H: hlgG1; H1M: mlgG1; H2M: mlgG2; H3M: mlgG3 Notă: variația raporturilor de intensitate de legare între același anticorp exprimat cu un Fc de șoarece și Fc uman se datorează utilizării diferiților reactivi de detectare secundară SULFO-TAG.		

După cum arată rezultatele din Tabelul 3, majoritatea anticorpilor anti-MUC16 din această invenție s-au legat în mod specific la OVCAR-3 atât la concentrații de anticorpi mari (16,7 nM) cât și scăzute (1,9 nM). Anticorpii de control izotip mlgG1, mlgG2a și hlgG1 nu au arătat nicio legare specifică nici la OVCAR-3, nici la linia celulară SK-OV-3. În plus, există dovezi că metoda este sensibilă, deoarece câțiva anticorpi care nu au prezentat legare la proteina MUC16 umană monomerică solubilă într-un test de legare a rezonanței plasmonilor de suprafață (vezi Exemplul 4 de mai jos) au prezentat legare specifică la MUC16 uman endogen exprimat pe celulele OVCAR-3 în acest test de legare pe bază de celule.

Exemplul 3: Generarea de anticorpi bispecifici care leagă celule specifice ovariene (MUC16) și CD3

Prezenta dezvăluire furnizează molecule bispecifice de legare la antigen care leagă CD3 și MUC16; astfel de molecule bispecifice de legare a antigenului sunt denumite aici, de asemenea, „molecule bispecifice anti-MUC16/anti-CD3 sau anti-MUC16xCD3. „Porțiunea anti-MUC16 a moleculei bispecifice anti-MUC16/anti-CD3 este utilă pentru țintirea celulelor tumorale care exprimă MUC16 (cunoscută și ca CA-125), iar porțiunea anti-CD3 a moleculei bispecifice este utilă pentru activarea T. - celule. Legarea simultană a MUC16 pe o celulă tumorală și CD3 pe o celulă T facilitează uciderea direcționată (liza celulară) a celulei tumorale vizate de către celula T activată.

Anticorpii bispecifici cuprinzând un domeniu de legare specific anti-MUC16 și un domeniu de legare specific anti-CD3 au fost construiți folosind metodologii standard, în care domeniul de legare a antigenului anti-MUC16 și domeniul de legare a antigenului anti-CD3 cuprind fiecare HCVR-uri diferite, distincte, asociate cu un LCVR comun. În anticorpii bispecifici exemplificați, moleculele au fost

construite utilizând un lanț greu de la un anticorp anti-CD3, un lanț greu de la un anticorp anti-MUC16 și un lanț ușor comun de la anticorpul anti-MUC16. În alte cazuri, anticorpii bispecifici pot fi construiți utilizând un lanț greu de la un anticorp anti-CD3, un lanț greu de la un anticorp anti-MUC16 și un lanț ușor de la un anticorp anti-CD3 sau un lanț ușor de anticorp cunoscut a fi promiscuu sau se potrivește eficient cu o varietate de brațe grele de lanț.

Anticorpii bispecifici descriși în următoarele exemple constau din brațe de legare anti-CD3 având afinități de legare diferite la proteina hCD3ε/δ heterodimerică umană solubilă (așa cum este descris în Exemplul 15 de aici); și MUC16 uman (vezi Exemplele 1-2 de mai sus). Anticorpii bispecifici exemplificați au fost fabricați având un domeniu Fc IgG1 (BSMUC16/CD3-001, -002, -003 și -004) sau un domeniu Fc IgG4 modificat (himeric) (BSMUC16/CD3-005) așa cum este stabilit în cererea de brevet SUA Publicația nr. US20140243504A1, publicată la 28 august 2014.

Un rezumat al părților componente ale domeniilor de legare la antigen ale diferiților anticorpi bispecifici anti-MUC16xCD3 construiți este prezentat în Tabelul 4.

Tabelul 4: Rezumatul părților componente ale anticorpilor bispecifici anti-MUC16xCD3 selectați

Identificatorul anticorpului bispecific	Anti-MUC16	Anti-CD3	Regiunea variabilă a lanțului ușor comun
	Domeniul de legare la antigen	Domeniul de legare la antigen	
	Regiunea variabilă a lanțului greu	Regiunea variabilă a lanțului greu	
BSMUC16/CD3-001	H1H8767P (SEQ ID NO:18)	CD3-VH-G (SEQ ID NO: 1730)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-002	H1H8767P (SEQ ID NO:18)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO:1762)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-003	H1H8767P (SEQ ID NO:18)	CD3-VH-G9 (SEQ ID NO:1778)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-004	H1H8767P (SEQ ID NO:18)	CD3-VH-G10 (SEQ ID NO:1786)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)
BSMUC16/CD3-005	H1H8767P (SEQ ID NO:18)	CD3-VH-G20 (SEQ ID NO:1866)	H1H8767P (SEQ ID NO: 26)

Lanțurile ușoare enumerate în Tabelul 4 au fost comune atât brațelor de țintire CD3 cât și MUC16 ale anticorpilor bispecifici. Tabelele 1 și 2 prezintă identificatorii de secvență de aminoacizi și, respectiv, de acid nucleic pentru diferitele regiuni variabile ale lanțului greu și CDR-urile corespunzătoare ale brațelor anti-MUC16 ale anticorpilor bispecifici din acest Exemplu. Tabelele 22 și 23 prezintă identificatorii de secvență de aminoacizi și, respectiv, de acid nucleic, pentru diferitele regiuni variabile ale lanțului greu și CDR-urile corespunzătoare ale brațelor anti-CD3 ale anticorpilor bispecifici din acest Exemplu.

Exemplul 4: Afinitățile de legare și constantele cinetice derivate de rezonanța plasmonului de suprafață ale anticorpilor monoclonali umani anti-MUC16 monospecifici și anti-MUC16xCD3 bispecifici

Afinitățile de legare și constantele cinetice ale anticorpilor umani anti-MUC16 au fost determinate prin rezonanță plasmonică de suprafață în timp real (SPR; Biacore 4000 sau Biacore T-200, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) la 25°C. Anticorpii anti-MUC16 testați în acest exemplu au fost lanți monospecifici bivalenți la MUC16 (exprimați cu o regiune constantă hlgG1 (H1 H), mlgG1 (H1 M), mlgG2 (H2M) sau mlgG3 (H3M) sau anticorpi bispecifici cuprinși dintr-un anti- -Domeniu de legare MUC16 și un domeniu de legare anti-CD3. Anticorpii au fost capturați pe o suprafață a senzorului CM4 sau CM5 Biacore (GE Healthcare Life Sciences) derivatizată prin cuplarea amină cu un anticorp monoclonal anti-uman Fc (GE, # BR-1008-39) sau un anticorp monoclonal anti-șoarece Fc de capră (GE, # BR-1008-38). Diverse concentrații de MUC16 uman monomeric solubil, într-un format trunchiat, cuprinzând ultimele cinci domenii SEA ale Mucin-16 (hMUC16.mmh, sau MUC16 „nub”, SEQ ID: 1902) au fost injectate pe suprafața captată de anticorp anti-MUC16 la un debit de 50uL/minut (Biacore T-200) sau 30uL/minut (Biacore 4000).

Asocierea anticorp-reactiv a fost monitorizată timp de 4 minute și disocierea a fost monitorizată timp de 6-10 minute. Toate studiile de legare au fost efectuate în tampon HBS-ET (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Surfactant P20).

- 5 Constantele vitezei de asociere cinetică (k_a) și disociere (k_d) au fost determinate prin ajustarea senzogramelor în timp real la un model de legare 1: 1 utilizând software-ul de ajustare a curbei Scrubber 2.0c. Constantele de echilibru de disociere de legare (D) și timpii de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) au fost calculate din constantele vitezei cinetice ca:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{and} \quad t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

- 10 Parametrii cinetici de legare pentru anticorpii monospecifici anti-MUC16 la un fragment monomer al proteinei umane MUC16 sunt prezentați mai jos în tabelele 5A și 5B. Parametrii cinetici de legare pentru anticorpii bispecifici anti-MUC16/anti-CD3 la proteina monomerică MUC16 umană sunt prezentați mai jos în Tabelul 6.

- 15 **Tabelul 5A: Afinitățile de legare Biacore ale anticorpilor Anti-MUC16 Hibridoma (H1M, H2M și H3M) la fragmentul hMUC16 la 25 °C**

ID Anticorp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2M7128N	1.89E+05	6.40E-04	3.39E-09	18
H1M7129N	5.31E+04	1.04E-04	1.97E-09	111
H2M7131N	6.47E+04	1.62E-04	2.51E-09	71
H3M7132N	2.57E+04	1.96E-04	7.62E-09	59
H2M7133N	1.67E+05	3.77E-04	2.26E-09	31
H2M7134N	6.55E+04	1.62E-04	2.47E-09	71
H2M7135N	5.10E+04	2.18E-04	4.27E-09	53
H1M7137N	5.30E+04	9.09E-05	1.72E-09	127
H2M7138N	7.41E+04	9.25E-05	1.25E-09	125
H1M9519N	NB	NB	NB	NB
H1M9521N	NB	NB	NB	NB
H3M9524N	NB	NB	NB	NB
H3M9525N	NB	NB	NB	NB
H1M9528N	NB	NB	NB	NB
H3M9529N	NB	NB	NB	NB
NB: Nicio legătură				

Tabelul 5B: Afinitățile de legare Biacore ale anticorpilor anti-MUC16 Fc uman (H1H) la fragmentul hMUC16 la 25°C

ID Anticorp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H8755P	5.22E+05	1.49E-04	2.86E-10	77
H1H8767P	1.17E+05	4.18E-04	3.58E-09	28
H1H8770P	2.47E+05	3.08E-04	1.25E-09	38

- 20 (continuare)

ID Anticorp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H8783P	1.74E+05	1.07E-04	6.14E-10	108
H1H8790P	1.01E+05	7.61E-04	7.53E-09	15

H1H8794P	3.62E+05	2.79E-04	7.71E-10	41
H1H8799P	7.90E+04	3.66E-04	4.63E-09	32
H1H8799P2	7.58E+04	3.73E-04	4.92E-09	31
H1H8804P	4.94E+04	6.07E-04	1.23E-08	19
H1H8808P	4.12E+03	2.16E-04	5.24E-08	54
H1H8810P	5.77E+04	3.16E-04	5.48E-09	37
H1H8813P	5.32E+04	2.32E-04	4.35E-09	50

Tabelul 6: Afinități de legare biacore ale anticorpilor bispecfici anti-MUC16/ anti-CD3 la fragmentul hMUC16 la 25°C

Identificatorul anticorpului bispecific	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t 1/2 (min)
BSMUC16/CD3-001	9.48E+04	5.86E-04	6.18E-09	20
BSMUC16/CD3-005	9.41E+04	5.64E-04	6.00E-09	21

După cum arată rezultatele, majoritatea anticorpilor anti-MUC16 ai acestei invenții s-au legat la proteina MUC16 umană solubilă, unii prezentând afinitate subnanomolară. Câțiva anticorpi (H1M9519N, H1M9521N, H3M9524N, H3M9525N, H1M9528N, H3M9529N) nu au afișat nicio legare la formatul trunchiat care cuprind ultimele cinci domenii SEA prin rezonanța plasmonului de suprafață, totuși, leagă de MUC16AR specifică endogenului uman. 3 celule într-un test de legare pe bază de celule. Anticorpii bispecfici anti-MUC16xCD3 ai acestei dezvăluiri s-au legat de asemenea la proteina MUC16 umană trunchiată solubilă care prezintă afinitate nanomolară în acest test.

Exemplul 5: Proprietăți suplimentare de legare, activare a celulelor T și citotoxicitate ale anticorpilor bispecfici exemplificați

În acest exemplu, a fost determinată capacitatea anticorpilor bispecfici MUC16xCD3 de a se lega la liniile de celule umane care exprimă CD3 (celule T umane), în comparație cu legarea la liniile de celule specifice țintei (specifice MUC16), prin FACS. În plus, capacitatea acestor anticorpi bispecfici de a se activa la linii celulare specifice țintei (specifice MUC16) a fost de asemenea comparată într-un test similar.

Titarea de legare a anticorpilor bispecfici exemplificați măsurată prin analiza FACS

A. Pe scurt, analiza citometrică în flux (adică sortarea celulelor activate prin fluorescență sau FACS) a fost utilizată pentru a determina legarea anticorpilor bispecfici la celulele Jurkat sau la celulele care exprimă MUC16 uman, urmată de detectarea cu ficoeritrină (PE) sau marcată cu APC. anticorpi anti-IgG uman. Pe scurt, 2x 10⁵ celule/godeu au fost incubate timp de 30 de minute la 4°C cu o diluție în serie variind de la 1,33E-07M la 8,03E-12M din fiecare anticorp de testat sau control izotip (anticorp de același izotip care leagă un antigen diferit fără încrucișare). -reactivitate la MUC16 sau CD3). După incubare, celulele au fost spălate de două ori cu PBS rece conținând 1% FBS filtrat și a fost adăugat la celule un anticorp secundar anti-uman conjugat cu PE sau conjugat cu APC și incubat timp de încă 30 de minute. Godeurile care nu conțin anticorp sau numai secundar au fost, de asemenea, utilizate ca martori. După incubare, celulele au fost spălate, resuspendate în 200 μL PBS rece care conține 1% FBS filtrat și analizate prin citometrie în flux pe un BD FACS Canto II. Vezi Tabelul 7A.

B. În experimente separate cu condiții analoge celor descrise mai sus, analiza citometrică în flux (sau FACS) a fost utilizată pentru a determina legarea anticorpilor bispecfici selectați la celulele Jurkat, PEO-1, OVCAR3-Luc și celulele T cynomolgus. Pentru analiza de titrare, diluarea în serie a anticorpilor bispecfici MUC16xCD3 selectați, un prim anticorp de control izotip (un anticorp uman himeric IgG4 care leagă un antigen uman irelevant, fără reactivitate încrucișată cu CD3 uman sau cynomolgus) și un al doilea anticorp de control izotip (un om). anticorp himeric IgG4 care leagă un antigen uman irelevant fără reactivitate încrucișată la MUC16 uman), variind de la 66,6 nM la 0,001 nM. Vezi Tabelul 7B și Fig. 11A-11 C.

Pentru analiza FACS, celulele au fost încadrate în funcție de înălțimea de împrăștiere înainte față de zona de împrăștiere înainte pentru selecția evenimentelor individuale, urmată de împrăștiere laterală și directă. EC₅₀ pentru titrarea legării celulelor a fost determinat folosind software-ul PRISM™ (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Valorile au fost calculate utilizând analiza de regresie neliniară cu 4

parametri. (Liu, J., și colab. 2005, Biotechnol Letters 27: 1821-1827). Valoarea EC_{50} reprezintă concentrația anticorpului testat unde se observă 50% din legarea sa maximă.

Tabelul 7A: Legarea FACS pe liniile celulare specifice CD3 și MUC16

Identificatorul anticorpului bispecific	Brațul de legare Anti-CD3	FACS titrarea de legare EC_{50} [M]	
		Jurkat	OVCAR3 (MUC16+)
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.21E-09	1.20E-09
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	Very weak	2.69E-09

Tabelul 7B: Legarea FACS pe liniile celulare specifice CD3 și MUC16

Identificatorul anticorpului bispecific	Brațul de legare Anti-CD3	FACS titrarea de legare EC_{50} [M]			
		PEO-1 (MUC16+)	OVCAR3-Luc (MUC16+)	Jurkat	Celule T Cinomolgus
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.02E-09	1.32E-09	6.44E-09	1.56E-08
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.13E-09	Not tested	3.01E-07	No Binding
BSMUC16/CD3-005	CD3-VH-G20	2.63E-09	1.47E-09	6.26E-08	1.17E-06

Așa cum se arată în tabelele 7A și 7B, brațele de legare CD3 ale fiecărui anticorp bispecific MUC16 au prezentat o gamă de legare celulară la celulele T care exprimă CD3 uman și de maimuță (de exemplu, de la EC_{50} 3,2 nM până la legare foarte slabă). Anticorpul bispecific BSMUC16/CD3-001 a arătat o măsurare ridicată a legării la celulele care exprimă CD3 (adică <7 nM), în timp ce anticorpul bispecific BSMUC16/CD3-002 a arătat o legare slabă spre deloc la celulele care exprimă CD3 umane și de maimuță. Legarea nemăsurabilă sau nicio legare măsurabilă, în testul FACS sau testul echivalent se referă la o interacțiune de legare între anticorp și antigenul său țintă care depășește limita de detectare a testului (de exemplu, la sau peste 1 μ M). Anticorpul bispecific testat au prezentat o legare celulară similară pe liniile celulare care exprimă MUC16, confirmând faptul că împerecherea bispecifică cu brațele CD3 individuale care prezintă interacțiuni mari sau slabe (sau deloc măsurabile) cu CD3 nu a afectat sau diminuat legarea specifică țintei tumorii (legarea specifică MUC16). a fost mai mică sau egală cu 3 nM (legare ridicată) în aceste exemple. Primul anticorp de control nu s-a legat de celulele CD3+, iar cel de-al doilea anticorp de control nu s-a legat de celulele MUC16+.

Vezi, de asemenea, Fig. 11A-11 C.

Anticorpul care prezintă legare slabă până la deloc detectabilă la CD3 uman sunt încă considerați avantajosi pentru împerecherea bispecifică determinată de aviditate și au fost testați suplimentar pentru citotoxicitate în teste in vitro (vezi mai jos) și in vivo (Exemplul 8).

Activarea celulelor T și citotoxicitatea specifică tumorii prezentate de anticorpi bispecifici măsurată in vitro

A. Uciderea specifică a celulelor țintă tumorale care exprimă MUC16 în prezența anticorpilor bispecifici pe bază de CD3 a fost monitorizată prin citometrie în flux. După cum s-a raportat anterior, anticorpul bispecific au prezentat abilități diferențiale de legare la proteina CD3 și la liniile celulare care exprimă CD3 (adică legare foarte slabă sau puternică). Acești anticorpi bispecifici au fost testați pentru capacitatea de a induce celulele T umane naive să redirecționeze uciderea către celulele care exprimă țintă. Pe scurt, liniile celulare care exprimă MUC16 (OVCAR3) au fost etichetate cu 1 μ M de colorant de urmărire fluorescent Violet Cell Tracker. După marcarea, celulele au fost placate peste noapte la 37°C. Separat, PBMC-urile umane au fost placate în mediu RPMI suplimentat la 1×10^6 celule/mL și incubate peste noapte la 37°C pentru a se îmbogăți limfocite prin epuizarea macrofagelor aderente, a celulelor dendritice și a unor monocite. A doua zi, celulele țintă au fost co-incubate cu PBMC nestimulate epuizate de celule aderente (raportul 4:1 celula țintă/efector) și o diluție în serie de anticorpi bispecifici relevanți sau control izotip (interval de concentrație: 66,7 nM până la 0,25 pM) timp de 48 ore la 37°C. Celulele au fost îndepărtate din plăci de cultură celulară folosind un tampon de disociere celulară fără enzime și analizate prin FACS. A se vedea rezultatele reprezentate în Tabelul 8A.

B. În studii analoge, liniile celulare care exprimă MUC16 (PEO-1 sau OVCAR3-Luc) au fost marcate, placate și incubate peste noapte, așa cum s-a descris. Au fost co-incubate diluții în serie de

anticorpi bispecfici MUC16xCD3 sau de control izotip. A se vedea rezultatele prezentate în tabelele 8B și 8C și în figurile 12A-12B.

Pentru analiza FACS, celulele au fost colorate cu un urmărit de celule roșii îndepărtate mort/vii (Invitrogen). S-au adăugat 5×10^5 perle de numărare în fiecare godeu imediat înainte de analiza FACS. Au fost colectate 1×10^4 margele pentru fiecare probă. Pentru evaluarea specificității uciderii, celulele au fost încadrate pe populații vii marcate cu violet. Procentul din populația vie a fost înregistrat și utilizat pentru calcularea supraviețuirii normalizate.

Activarea celulelor T a fost evaluată prin incubarea celulelor cu anticorpi conjugați direct la CD2, CD69 și/sau CD25 și prin raportarea procentului de celule T activate timpuriu (CD69+) și/sau celule T activate târziu (CD25+) din totalul celulelor T (CD2+).

După cum arată rezultatele din tabelele 8A-8C, epuizarea celulelor care exprimă MUC16 a fost observată cu bispecfici anti-MUC16xCD3. Toți anticorpii bispecfici testați au activat și direcționat celulele T umane pentru a epuiza celulele țintă cu EC₅₀ în intervalul picomolar. În plus, liza (epuizarea) celei țintă observată a fost asociată cu o reglare în sus a CD69 (sau CD25) pe celulele T CD2+, de asemenea, cu EC₅₀ picomolare (pM).

Important, rezultatele acestui exemplu demonstrează, de asemenea, că un anticorp bispecific construit cu un braț de legare CD3 care a afișat o legare slabă până la deloc măsurabilă la proteina CD3 sau la celulele care exprimă CD3 (de ex.

CD3-VH-G5) și-au păstrat încă capacitatea de a activa celulele T și au prezentat o citotoxicitate puternică a celulelor care exprimă antigenul tumoral.

Tabelul 8A: Citotoxicitatea și proprietățile de activare a celulelor T ale anticorpilor bispecfici MUC16xCD3 selectați

Identificatorul anticorpului bispecific	Brațul de legare Anti-CD3	OVCAR3 epuizarea celulelor EC ₅₀ [M]	Activarea celulelor T (CD69 suprareglementare) EC ₅₀ [M]
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	2.24E-11	5.88E-12
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.06E-11	1.01E-11

Tabelul 8B: Citotoxicitatea și proprietățile de activare a celulelor T ale Anticorpilor bispecfici MUC16xCD3 selectați

Identificatorul anticorpului bispecific	PEO-1 epuizarea celulelor EC ₅₀ [M]	Activarea celulelor T (CD69 suprareglementare) EC ₅₀ [M]	Activarea celulelor T (CD25 suprareglementare) EC ₅₀ [M]
BSMUC16/CD3-001	2.56E-11	8.34E-12	3.90E-11
BSMUC16/CD3-002	6.75E-11	1.34E-11	8.89E-11
BSMUC16/CD3-005	7.74E-11	1.72E-11	1.06E-10

Tabelul 8C: Citotoxicitatea și proprietățile de activare a celulelor T ale Anticorpilor bispecfici MUC16xCD3 selectați

Identificatorul anticorpului bispecific	OVCAR3-Luc epuizarea celulelor EC ₅₀ [M]	Activarea celulelor T (CD69 suprareglementare) EC ₅₀ [M]	Activarea celulelor T (CD25 suprareglementare) EC ₅₀ [M]
BSMUC16/CD3-001	1.54E-11	2.98E-12	3.06E-11
BSMUC16/CD3-005	5.16E-11	1.54E-11	1.17E-10

Exemplul 6: Cartografierea epitopului bazată pe schimbul de hidrogen/deuteriu (H/D) a anticorpilor Anti-Muc 16 H4sH8767P, H1H8794P2 și H1H8799P2 care se leagă la o porțiune a domeniului C-termen al hMUC16

Au fost efectuate experimente pentru a determina resturile de aminoacizi MUC16 din cele cinci domenii SEA C-terminale (SEQ ID No: 1902, denumită în continuare hMUC16.nub), cu care interacționează anticorpii anti-MUC16 H4sH8767P, H1H8794P2 și H1H8799P2. În acest scop, a fost utilizată maparea epitopului de schimb hidrogen/deuteriu (H/D) cu spectrometrie de masă (HDX-MS).

O descriere generală a metodei de schimb H/D este prezentată în Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; și Engen și Smith (2001) Anal. Chim. 73:256A-265A.

Experimentele HDX-MS au fost efectuate pe o platformă integrată Waters HDX/MS, constând dintr-un sistem Leaptac HDX PAL pentru etichetarea deuteriului, un Waters Acquity M-Class (Manager de solvent auxiliar) pentru digestia și încărcarea probei, un Waters Acquity M-Class (μ Binary solvent manager) pentru gradientul coloanei analitice și un spectrometru de masă Synapt G2-Si pentru măsurarea masei peptidei peptice.

Soluția de marcarea a fost preparată în tampon PBS 10 mM în D₂O la pD 7,0.

Pentru marcarea cu deuteriu, s-au incubat 3,8 μ L de hMUC16.nub (12 pmoI/ μ L) sau hMUC16.nub preamestecat cu anticorpus anti-MUC16 H4sH8767P, H1H8794P2 sau H1H8799P2 în raport molar 2:1 a fost incubat cu 56,2 μ L. Soluție de marcarea D₂O pentru diferite momente de timp (de exemplu: control nedeuterat = 0 sec; etichetare cu deuteriu: 1 min și 20 min). Deuterarea a fost stinsă prin transferul a 50 μ L la 50 μ L tampon de stingere pre-răcit (0,2 M TCEP, 6 M clorură de guanidină în 100 mM tampon fosfat, pH 2,5) și proba amestecată a fost incubată la 1,0 °C timp de două minute. Proba stinsă a fost apoi injectată într-un Waters HDX Manager pentru digestia online pepsină/protează XIII. Peptidele digerate au fost prinse pe o precoloană VanGuard ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 2,1x5 mm la 0°C și eluate într-o coloană analitică ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7- μ m, 1,0x50 mm) timp de 9 minute. separare în gradient de 5%-40% B (faza mobilă A: 0,1 % acid formic în apă, faza mobilă B: 0,1 % acid formic în acetonitril). Spectrometrul de masă a folosit o tensiune conică de 37 V, un timp de scanare de 0,5 s și un interval de masă/încărcare de 50-1700 Th.

Pentru identificarea resturilor de peptide ale hMUC16.nub cu care interacționează H4sH8767P, H1H8794P2 și H1H8799P2, datele LC-MS^E din proba neuterată au fost procesate și căutate într-o bază de date care includea secvențe pentru hMUC16.nub, pepsină aleatorie și o secvență aleatorie. folosind software-ul Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Peptidele identificate au fost importate în software-ul DynamX și filtrate după două criterii: 1) produse minime per aminoacid: 0,25 și 2) pragul fișierului de replicare: 2. Software-ul DynamX a determinat apoi automat absorbția de deuteriu a fiecărei peptide, pe baza timpului de retenție și a preciziei înalte a masei (<10 ppm) în mai multe momente de timp cu 3 replici de fiecare dată.

Folosind coloana online pepsină/protează XIII cuplată cu achiziția MSedata, au fost identificate un total de 109 peptide de la hMUC16.nub în absența sau prezența H4sH8767P, reprezentând 64% acoperire a secvenței. Șase peptide au redus semnificativ absorbția de deuteră (valori delta centroid > 0,5 daltoni de la cel puțin un punct de timp cu valori p < 0,05) atunci când s-au legat la H4sH8767P și sunt ilustrate în Tabelul 9A. Masa peptidei înregistrată corespunde valorii medii a centroidului MH⁺ masă din trei replici. Aceste peptide, corespunzând aminoacizilor 428-434, 453-467 și 474-481 ai hMuc16.nub, au avut viteze mai lente de deuterare atunci când s-au legat la H4sH8767P. Aceste reziduuri identificate corespund, de asemenea, reziduurilor 14237-14243, 14262-14276 și 14283-14290 ale hMUC16 așa cum sunt definite de intrarea Uniprot Q8WXI7 (MUC16_HUMAN), SEQ ID NO: 1899.

Tabelul 9A. hMUC16.nub Peptide cu rate de deuterare modificate la legarea H4sH8767P

Reziduuri de SEQ ID NO:	Secveța de Amino Acid	1min Deuterare			20 min Deuterare		
		hMUC16. nub	hMUC16.nub + 4sH8767P	Δ	hMUC16 . nub	hMUC16.nub + H4sH8767P	Δ
428-434	LYKGSQ	809,97 $\pm$ 0,03	809,07 $\pm$ 0,06	-0,26	811,05 $\pm$ 0,16	810,17 $\pm$ 0,01	-0,88
429-434	YKGSQ	697,10 $\pm$ 0,00	696,74 $\pm$ 0,00	-0,35	698,13 $\pm$ 0,02	697,60 $\pm$ 0,03	-0,52
453-467	VTVKALFS S NLDPSL	1595,35 $\pm$ 0,08	1593,97 $\pm$ 0,2	-1,38	1596,01 $\pm$ 0,08	1595,33 $\pm$ 0,03	-0,68
459-467	FSSNLDPSL	983,19 $\pm$ 0,01	981,57 $\pm$ 0,08	-1,62	983,51 $\pm$ 0,03	982,76 $\pm$ 0,07	-0,75
460,467	SSNLDPSL	835,44 $\pm$ 0,01	834,01 $\pm$ 0,00	-1,43	835,89 $\pm$ 0,01	835,12 $\pm$ 0,15	-0,74
474-481	DKTLNASF	899,76 $\pm$ 0,00	899,25 $\pm$ 0,06	-0,51	900,63 $\pm$ 0,00	900,10 $\pm$ 0,03	-0,54

Folosind coloana online pepsină/protează XIII cuplată cu achiziția MSedata, au fost identificate un total de 109 peptide de la hMUC16.nub în absența sau prezența H1H8794P2, reprezentând o acoperire

de secvență de 64%. Trei peptide au redus semnificativ absorbția de deuteră (valori delta centroid > 0,5 daltoni de la cel puțin un punct de timp cu valori $p < 0,05$) când s-au legat la H1H8794P2 și sunt ilustrate în Tabelul 9B. Masa peptidei înregistrată corespunde valorii medii a centroidului MH^+ masă din trei replici. Aceste peptide, corespunzând aminoacizilor 126-131, 127-131 și 132-138 ai hMuc16.nub, au avut rate mai lente de deuteration atunci când s-au legat la H1H8794P2. Aceste reziduuri identificate corespund, de asemenea, reziduurilor 13935-13940, 13936-13940 și 13941-13947 ale hMUC16 așa cum sunt definite de intrarea Uniprot Q8WXI7 (MUC16_HUMAN), SEQ ID NO: 1899.

Tabelul 9B. hMUC16.nub Peptide cu rate de deuteration modificate la legarea H1H8794P2

Reziduuri de SEQ ID NO: 1902	Secvența Amino Acid	1min Deuturare			20 min Deuturare		
		hMUC16. nub	hMUC16.nub + H1H8794P2	Δ	hMUC16 . nub	hMUC16.nub + H1H8794P2	Δ
126-131	LYMAD	771,41±0,01	770,60±0,04	-0,81	771,91±0,04	770,76±0,02	-1,15
127-131	RYMAD	658,03±0,02	657,32±0,01	-0,71	657,89±0,01	657,27±0,01	-0,6
132-138	MGQPGSL	692,55±0,02	691,42±0,15	-1,13	692,61±0,01	691,58±0,02	-1,03

Folosind coloana online pepsină/protează XIII cuplată cu achiziția de date MS^E , au fost identificate un total de 109 peptide de la hMUC16.nub în absența sau prezența H1H8799P2, reprezentând o acoperire a secvenței de 64%. Patru peptide au redus semnificativ absorbția de deuteră (valori delta centroid > 0,5 daltoni de la cel puțin un moment de timp cu valori $p < 0,05$) când s-au legat la H1H8799P2 și sunt ilustrate în Tabelul 9C. Masa peptidei înregistrată corespunde valorii medii a centroidului MH^+ masă din trei replici. Aceste peptide, corespunzând aminoacizilor 357-369, 358-366, 358-369 și 361-369 ai hMuc16.nub, au avut viteze mai lente de deuteration atunci când s-au legat la H1H8799P2. Aceste reziduuri identificate corespund, de asemenea, reziduurilor 14165-14178, 14166-14176, 14166-14178 și 14170-14178 ale hMUC16 așa cum sunt definite de intrarea Uniprot Q8WXI7 (MUC16_HUMAN), SEQ899 ID NO.

Tabelul 9C. hMUC16.nub Peptide cu rate de deuteration modificate la legarea H1H8799P2

Reziduuri SEQ ID NO: 1902	Secvența Amino Acid	1min Deuturare			20 min Deuturare		
		hMUC16. nub	hMUC16.nub + H1H8799P2	Δ	hMUC16 . nub	hMUC16.nu + H1H8799P2	Δ
357-369	LSQLTHGVT QLGF	1404,15±0,03	1403,41±0,09	-0,74	1406,14±0,15	1404,26±0,02	-2,11
358-366	SQLTHGVT QL	972,37±0,10	972,04±0,10	-0,33	973,94±0,03	972,56±0,00	-1,38
358-369	SQLTHGVT QLGF	1291,23±0,02	1290,20±0,00	-1,03	1291,34±0,02	1291,05±0,06	-227
361-369	THGVTQLGF	1404,15±0,03	1403,42±0,05	-0,73	1406,14±0,14	1404,03±0,02	-2,11

Exemplul 7: Evaluarea farmacocinetică a anticorpilor bispecfici anti-MUC16 x CD3

Evaluarea farmacocineticii anticorpilor bispecfici anti-MUC16 x CD3 BSMUC16/CD3-OO1 și BSMUC16/CD3-OO5 și un control izotip au fost efectuate la șoareci MUC16 x CD3 umanizați (șoareci homozigoți pentru expresia MUC16 și CD3 umană, MUC16^{hu/hu} x CD3^{hu/hu}) șoareci umanizați CD3 (șoareci homozigoți pentru exprimarea CD3 umană, CD3^{hu/hu}) și șoareci de tip sălbatic (WT) adaptați la tulpină (75% C57BL, 25%129Sv). Cohortele au conținut 4-5 șoareci per anticorp testat și per tulpină de șoareci. Toți șoarecii au primit un singur intraperitoneal (i.p.) Doza de 0,4 mg/kg. Au fost recoltate probe de sânge la 3 și 6 ore, 1, 3, 7, 14 și 28 de zile după administrare. Sângele a fost procesat în ser și congelat la -80 °C până a fost analizat.

Concentrațiile de anticorpi circulanți au fost determinate prin analiza totală a anticorpilor IgG umani utilizând GyroLab xPlore™ (Gyros, Uppsala, Suedia). Pe scurt, un anticorp policlonal anti-IgG

uman de capră biotinitat (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a fost capturat pe perle acoperite cu streptavidină pe un Gyrolab Bioaffy 200 CD (Gyros) pentru a captura IgG umană prezentă în ser. După capturarea coloanei de afinitate, anticorpii IgG uman legat în probe a fost detectat cu IgG anti-uman de capră marcat Alexa-647 (Jackson ImmunoResearch). Semnalul fluorescent pe coloană permis

5 pentru detectarea IgG legată și unitățile de răspuns (RU) au fost citite de instrument. Concentrațiile probelor au fost determinate prin interpolare dintr-o curbă standard care a fost potrivită utilizând o potrivire a curbei logistice cu 5 parametri folosind software-ul de evaluare Gyrolab.

Parametrii PK au fost determinați prin analiză non-compartimentală (NCA) utilizând software-ul Phoenix® WinNonlin® Versiunea 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) și un model de dozare

10 extravasculară. Folosind valorile medii ale concentrației respective pentru fiecare anticorp, toți parametrii PK, inclusiv concentrația maximă observată în ser (C_{max}), timpul de înjumătățire estimat observat ($t_{1/2}$) și aria sub curba concentrației în funcție de timp până la ultima concentrație măsurabilă (AUC_{last}).) au fost determinate folosind o regulă trapezoidală liniară cu interpolare liniară și ponderare uniformă

În urma i.p. administrarea de anticorpi la șoarecii WT, profilurile concentrației totale de IgG în

15 timp ale BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 și controlul izotipului au fost toate similare, caracterizate mai întâi printr-o scurtă distribuție a medicamentului urmată de o singură fază de eliminare a medicamentului pe parcursul întregii perioade. restul studiului. Concentrațiile serice maxime (C_{max}) și expunerea calculată la medicament (AUC_{last}) ale celor trei anticorpi au fost comparabile (în interval de 1,3 ori unul față de celălalt).

20 În urma i.p. administrarea de anticorpi în CD3^{hu/hu} șoarece, BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 și controlul izotipului au avut concentrații C_{max} comparabile (4,6, 3,6 și, respectiv, 4,1 $\mu\text{g/mL}$). BSMUC16/CD3-005 și controlul izotipului au prezentat curbe similare de eliminare a medicamentelor, în timp ce BSMUC16/CD3-001 au prezentat o eliminare mai abruptă a medicamentului decât ambele, sugerând că legarea CD3 umană a țintei conduce clearance-ul. Concentrația terminală de

25 anticorpi pentru BSMUC16/CD3-001 a fost de 0,03 $\mu\text{g/mL}$, ceea ce este de aproximativ 28 de ori mai mică decât concentrațiile terminale de anticorpi determinate pentru controlul izotipului (0,85 g/mL) și de 22 de ori mai puțin decât BSMUC16/CD3-005 (0,66 g/mL) concentrații serice.

La șoarecii dublu umanizați MUC16^{hu/hu} x CD3^{hu/hu}, anticorpii de control bispecfici și izotip Muc16xCD3 au avut concentrații C_{max} comparabile (C_{max} range: 4,5-6,9 $\mu\text{g/mL}$). Ambii anticorpi

30 bispecfici au prezentat o eliminare mai abruptă a medicamentului decât controlul izotipului sugerând un efect mediat de țintă. Concentrațiile terminale de anticorpi pentru BSMUC16/CD3-001 și BSMUC16/CD3-005 au fost de aproximativ 29 de ori, respectiv de 2,9 ori mai mici decât concentrațiile terminale de anticorpi determinate pentru controlul izotip (0,86 $\mu\text{g/mL}$).

Un rezumat al datelor pentru anticorpii bispecfici anti-MUC16 x CD3 totali și concentrațiile de

35 anticorpi de control izotip sunt rezumate în Tabelul 10. Parametrii medii PK sunt descriși în Tabelele 11A și 11B. Concentrațiile medii totale de anticorpi în funcție de timp sunt prezentate în figurile 1, 2 și 3. În concluzie, anticorpii bispecfici MUC16xCD3 au prezentat curbe similare de eliminare C_{max} și medicamente la șoarecii WT, dar BSMUC16/CD3-001 a afișat rate de eliminare mai abrupte decât BSMUC16/CD3-005 și controlul izotipului la șoarecii CD3 unic umanizat și MUC16/CD3 șoareci dublu

40 umanizați. Deoarece anticorpii bispecfici administrați în acest studiu PK sunt alcătuiți din același braț de legare anti-MUC16, rezultatele sugerează că puterea de legare a grupului de țintă CD3 poate juca un rol în nivelurile de expunere la medicamente (AUC_{last}) și ratele de eliminare a medicamentului. . Nici BSMUC16/CD3-001 sau BSMUC16/CD3-005 nu leagă șoarecele MUC16 sau CD3 de șoarece.

Tabelul 10: Concentrațiile medii de IgG totale în ser după o singură injecție intraperitoneală de 0,4 mg/kg de BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 și anticorpi de control izotip la șoareci WT, șoareci CD3 umanizați și șoareci MUC16 x CD3 umanizați

Anticorp	Timp (d)	Concentrația totală a mAb în serul de șoarece					
		WT		CD3 ^{hu/hu}		MUC16 ^{hu/hu} x CD3 ^{hu/hu}	
		Medie ($\mu\text{g/mL}$)	+/- SD	Medie ($\mu\text{g/mL}$)	+/- SD	Medie ($\mu\text{g/mL}$)	+/-SD
	0.13	5.39	0.34	4.30	0.29	6.77	1.52
	0.25	5.80	0.36	4.26	1.07	6.63	1.06
	1.00	4.13	0.43	2.87	0.71	4.89	0.53
	3.00	3.19	0.53	1.44	0.27	2.50	0.22

BSMUC16/CD3-001	7.00	2.61	0.73	0.72	0.13	1.20	0.22
	14.00	1.44	0.69	0.18	0.05	0.28	0.08
	21.00	0.93	NO	0.07	0.02	0.06	0.05
	28.00	0.60	NO	0.04	0.01	0.03	0.02
BSMUC16/CD3-005	0.13	4.23	0.62	3.35	1.15	4.35	0.24
	0.25	4.53	0.55	3.40	0.96	4.45	0.49
	1.00	3.47	0.32	2.72	0.42	3.00	0.61
	3.00	2.51	0.13	1.95	0.37	1.98	0.41
	7.00	2.02	0.24	2.31	0.67	1.58	0.36
	14.00	1.19	0.17	1.01	0.23	0.78	0.26
	21.00	1.19	0.29	1.19	0.11	0.66	0.29
	28.00	0.71	0.20	0.66	0.28	0.30	0.22
Control Izotip	0.13	5.07	1.16	5.43	1.30	6.56	0.70
	0.25	5.91	1.10	5.67	1.91	6.48	0.90
	1.00	2.64	0.24	2.98	1.14	2.82	0.30
	3.00	2.05	0.06	2.29	0.83	1.57	0.37
	7.00	1.80	0.25	2.14	0.85	1.96	0.37
	14.00	1.22	0.28	1.48	0.66	1.34	0.37
	21.00	1.20	0.58	1.43	0.72	1.24	0.44
	28.00	0.73	0.24	0.85	0.29	0.86	0.41

Timp: (h, când este menționat)= timpul în ore după injecția cu doză unică; D= Ziua de studiu; SD = Abatere standard; NU = Nedeterminat din cauza excluderii șoarecilor cu titruri anti-medicament pentru eliminarea medicamentelor

Tabelul 11A: Rezumatul parametrilor farmacocinetici: CD3^{hu/hu} șoareci umanizați

Parametru	Unități	Șoareci WT			Șoareci CD3 ^{hu/hu}		
		Control Izotip	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005	Control Izotip	BSMUC16/C D3-001	BSMUC16/CD3-005
C _{max}	μg/mL	5 ± 3	6 ± 0,4	5 ± 0,5	4,1 ± 3	4,6 ± 0,8	3,5 ± 1
T _{1/2}	d	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	14 ± 0,5	3,9 ± 0,6	11 ± 5
AUC _{last}	d•μg/mL	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	49 ± 20	16 ± 3	36 ± 13

C_{max}= Concentrație maximă; AUG = Aria sub curba concentrație-timp; AUC_{last}, = AUG calculată de la momentul zero până la momentul ultimei concentrații pozitive; T_{1/2}= Timpul de înjumătățire estimat observat

 5 Tabelul 11 B: Rezumatul parametrilor farmacocinetici: MUC16^{hu/hu} x CD3^{hu/hu} șoareci dublu umanizați

Parametru	Unități	Șoareci WT			Șoareci MUC16 ^{hu/hu} x CD3 ^{hu/hu}		
		Control Izotip	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005	Control Izotip	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005
C _{max}	mg/mL	5 ± 3	6 ± 0.4	5 ± 0.5	6.7 ± 0.7	6.9 ± 1	4.5 ± 4

T _{1/2}	d	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	12.9 ± 4	3.3 ± 0.8	8.2 ± 4
AUC _{last}	d•mg/mL	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	46 ± 10	27 ± 3	34 ± 11
C _{max} = Concentrație maximă; AUG = Aria sub curba concentrație-timp; AUC _{last} = AUG calculată de la momentul zero până la momentul ultimei concentrații pozitive; T _{1/2} = Timpul de înjumătățire estimat observat							

Exemplul 8: Anticorpilor bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 prezintă o eficacitate anti-tumorală puternică in vivo

Pentru a determina eficacitatea in vivo a anticorpilor bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 exemplari identificați ca având legare slabă sau inexistentă la CD3 uman și cynomolgus, au fost efectuate studii pe șoareci imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman. Eficacitatea anticorpilor bispecfici selectați a fost testată atât în modelele de dozare pentru tratament imediat, cât și în cazul tratamentului terapeutic.

Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 în modelele de xenogrefă tumorală umană

Pentru a evalua eficacitatea in vivo a bispecificilor anti-MUC16/anti-CD3 în studiile de xenogrefă tumorală umană, șoarecii NOD scid gamma (NSG) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) au fost preimplantați cu celule mononucleare din sângele periferic uman (PBMC). ReachBio LLC, Seattle, WA) și apoi au primit celule de ascită din linia de celule de cancer ovarian uman OVCAR-3 (American Type Tissue Culture, Manassas, VA) transdus cu luciferază (OVCAR-3/Luc). Celulele OVCAR-3 exprimă endogen MUC-16.

Pe scurt, șoarecii NSG au fost injectați intraperitoneal (i.p.) cu 5,0 x 10⁶ PBMC umane. 8d mai târziu, 1,5 x 10⁶ celule de ascită din linia celulară OVCAR-3/Luc, trecute anterior in vivo, au fost administrate i.p. la șoarecii NSG grețați cu PBMC. În grupul de tratament imediat, șoarecii au fost tratați i.p. în ziua implantării celulelor OVCAR-3/Luc cu anticorpi bispecfici MUC16/CD3 BSMUC16/CD3-001 sau BSMUC16/CD3-005 sau un control izotip, la o doză de 10μg/șoarece (N=5 șoareci/grup de tratament). În modelul de doză terapeutică, șoarecii au fost tratați i.p. 7d după implantarea tumorii cu anticorpi bispecfici MUC16/CD3 sau de control descriși mai sus, la o doză de 10μg/șoarece (N=5/grup de tratament).

În toate studiile, creșterea tumorii a fost monitorizată prin imagistica bioluminiscentă (BLI). Șoarecii au fost injectați i.p. cu substratul de luciferază D-luciferină suspendată în PBS (150 mg/kg) și fotografiată sub anestezie cu izofluran după 10 min. BLI a fost efectuat folosind sistemul Xenogen I VIS (Perkin Elmer, Hopkinton, MA) iar semnalele BLI au fost extrase folosind software-ul Living Image (Xenogen/Perkin Elmer). Regiunile de interes au fost desenate în jurul fiecărei mase celulare și intensitățile fotonului au fost înregistrate ca fotoni (p)/sec(s)/cm²/steradian(sr). Pentru grupul cu tratament imediat, datele sunt prezentate ca niveluri BLI 26d după implantarea tumorii (Tabelul 12A). Pentru grupul de tratament terapeutic, datele sunt prezentate ca modificarea ori a BLI între ziua 6 (1 zi înainte de tratament) și la punctul final al studiului (26 d după implantarea tumorii; Tabelul 12B).

După cum arată rezultatele, atât BSMUC16/CD3-001 cât și BSMUC16/CD3-005 au arătat o eficacitate similară în suprimarea creșterii tumorii în comparație cu controlul izotipului când BLI a fost măsurat în ziua 26 în modelul de dozare imediată.

Ambii anticorpi bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 au suprimat, de asemenea, creșterea tumorilor stabilite atunci când au fost administrați 7d după implantarea tumorii, în comparație cu martor. În rezumat, anticorpilor bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 ai acestei invenții prezintă o eficacitate anti-tumorală puternică în mai multe modele.

Tabelul 12A: Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-MUC16/anti-CD3 în modelul de xenogrefă imun-compromis: dozare imediată

Model Tumoră/ Tulpină șoarece/ Doză	Identificator al anticorpului bispecific	N	Avg Radianță medie bioluminiscentă (fotoni/sec/cm ² / steradian) Ziua 26 (mean ± SD)
OVCAR-3/Luc/ NSG/ 10μg/ șoarece	BSMUC16/CD3-001	5	1,4 x 10 ³ ± 3.5 x 10 ²
	BSMUC16/CD3-005	5	1,5 x 10 ³ ± 9.7 x 10 ²
	Control Izotip	5	2,0x10 ⁷ ± 1.0x10 ⁶

Tabelul 12B: Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-Muc 6/anti-CD3 în modelul de xenogrefă imun-compromisă: tratament terapeutic

Model Tulpină Doză	Tumără șoarece/ anticorpului bispecific	Identificator al N	Schimbarea Avg de pliere a luminii bioluminiscente [p/s/cm ² /sr] la Ziua 26 relativ la Ziua 6 (mean 6 SD)
OVCAR-3/Luc NSG/ 10μg / șoarece	BSMUC16/CD3-001	5	2.0 ± 5.0
	BSMUC16/CD3-005	5	0.01 ± 0.02
	Control Izotip	5	21.0 ± 8.0

În experimente suplimentare, eficacitatea in vivo a unui anticorp bispecific anti-MUC16/anti-CD3 a fost evaluată în modele de tumori xenogenice și singeneice. Pentru primul model xenogenic, șoarecii NSG au fost injectați intraperitoneal (IP) cu celule OVCAR-3/Luc trecute anterior in vivo (Ziua 0) la unsprezece zile după grefarea cu PBMC umane. Șoarecii au fost tratați IP cu 0,01, 0,1 sau 0,5 mg/kg BSMUC16/CD3-001 sau li s-au administrat 0,5 mg/kg de control fără legare sau de control de legare CD3 în zilele 6, 10, 13, 16 și 21. Sarcina tumorală a fost evaluată de BLI în zilele 6, 14 și 20 după implantarea tumorii. Tratamentul cu 0,1 sau 0,5 mg/kg de BSMUC16/CD3-001 a dus la o eficacitate anti-tumorală semnificativă, determinată de măsurătorile BLI în ziua 20, așa cum se arată în tabelele 13A-C și în figurile 4-6. Pentru cel de-al doilea model xenogenic, șoarecii NSG au fost injectați cu celule OVCAR-3/Luc trecute anterior in vivo (Ziua 0) la treisprezece zile după grefare cu PBMC umane și un al doilea lot de PBMC a fost transferat în Ziua 4. Șoarecii au fost tratați intravenos (IV) cu 0,1, 0,5, 1 sau 5 mg/kg BSMUC16/CD3-005 sau li s-au administrat 5 mg/kg de control fără legare sau de control de legare CD3 în zilele 5, 8, 12, 15, 19 și 22. Povara tumorală a fost evaluată de BLI în zilele 4, 11, 18 și 25. Tratamentul cu 0,5, 1 sau 5 mg/kg BSMUC16/CD3-005 a dus la o eficacitate anti-tumorală semnificativă, așa cum se arată prin măsurătorile BLI și modificările pliilor (Tabelele 13D-F și Figurile 7-9). Pentru a examina eficacitatea într-un model imun-competent, gena CD3 murină a fost înlocuită cu CD3 uman și o porțiune a genei MUC16 de șoarece a fost înlocuită cu secvența umană. Înlocuirile au dus la un șoarece ale cărui celule T exprimă CD3 uman și care exprimă o moleculă MUC16 himerică care conține o porțiune de MUC16 uman la care se leagă anticorpul bispecific BSMUC16/CD3-001. Pentru modelul tumoral singenic, au fost utilizate linii celulare ID8-VEGF concepute pentru a exprima porțiunea de MUC16 uman. Șoarecii au fost implantați cu celule ID8-VEGF/huMUC16 subcutanat și tratat cu 100 μg de BSMUC16/CD3-001 fie în ziua implantării, fie la zece zile după implantare când s-au stabilit tumorile. Tratamentul cu 100 BSMUC16/CD3-001 a dus la o eficacitate antitumorală semnificativă, așa cum se arată în Tabelul 13G și Figura 10.

Implantarea și măsurarea tumorilor xenogrefe: Celulele de ascită din linia celulară OVCAR-3/Luc, trecute anterior in vivo, au fost administrate IP la șoarecii NSG grefați anterior cu PBMC umane. BLI a fost măsurat ca citire pentru creșterea tumorii la câteva zile după implantarea OVCAR-3/Luc și de mai multe ori în timpul studiului. După măsurarea inițială a BLI pentru cohortare, șoarecii au fost împărțiți în grupuri de 4-6 animale fiecare și au administrat anticorpi bispecfici sau de control MUC16xCD3 de două ori pe săptămână pe parcursul studiului.

Calculul creșterii și inhibării tumorii xenogrefei: Imagistica cu bioluminescență a fost utilizată pentru a măsura sarcina tumorii. Șoarecilor li s-a injectat IP cu 150 mg/kg (după cum s-a determinat prin greutatea corporale la începutul experimentului) de substrat de luciferază D-luciferină suspendată în PBS. La zece minute după dozare, imagistica BLI a șoarecilor a fost efectuată sub anestezie cu izofluran folosind Sistem Xenogen IVIS. Achiziția imaginii a fost efectuată cu câmpul vizual la D, înălțimea subiectului de 1,5 cm și nivel mediu de colectare pentru un timp de expunere de 0,5 minute. Semnalele BLI au fost extrase folosind software-ul Living Image. Regiunile de interes au fost desenate în jurul fiecărei mase tumorale și intensitățile fotonului au fost înregistrate ca p/s/cm²/sr. Analiza statistică a fost efectuată folosind software-ul GraphPad Prism (Versiunea 6). Semnificația statistică pentru rezultatele BLI a fost determinată utilizând un test t Mann-Whitney neparametric nepereche. Modificările de ori au fost calculate prin formula: (Ziua 20-Ziua 6)/Ziua 6 pentru studiul 1 și (Ziua 25-Ziua 4)/Ziua 4 pentru studiul 2.

Implantarea și măsurarea tumorilor singeneice: Șoarecii care exprimă CD3 uman și o himeră umană-murină a MUC16 în loci de șoarece corespunzătoare au fost implantați cu celule 10E6 ID8-VEGF/huMUC16 subcutanat (SC). Șoarecilor li s-a administrat BSMUC16/CD3-001 sau un control IP de legare la CD3, de două ori pe săptămână pe parcursul studiului. Tratamentul a început în ziua 0 sau în ziua 10 după implantare. Creșterea tumorii a fost măsurată cu șublere de două ori pe săptămână. Șoarecii au fost sacrificați la 47 de zile după implantarea tumorii.

Calculul creșterii și inhibării tumorii singeneice: Pentru a determina volumul tumorii prin șubler extern, s-au determinat cel mai mare diametru longitudinal (lungime) și cel mai mare diametru transversal (lățime). Volumul tumorii pe baza măsurătorilor calibrului a fost calculat prin formula: Volumul = (lungime x lățime²)/2.

- 5 Semnificația statistică a fost determinată utilizând un test t Mann-Whitney neparametric nepereche.

Eficacitatea antitumorală a anticorpului bispecific BSMUC16/CD3-001 în modelele de tumori xenogeneice și singeneice in vivo este prezentată în Tabelele 13A-D de mai jos.

- 10 **Tabelul 13A: Studiul 1 al modelului OVCAR-3. Nivelul bioluminescenței în ziua 6 după implantarea tumorii**

Anticorp (mg/kg)	Radianța medie [p/s/cm ² /sr] 6 zile după-implantare (median ± SEM)
controlul ne-legării (0,5)	8.15e+05 ± 7.88e+04
CD3-controlul legării (0,5)	6.39e+05 ± 8.67e+04
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	7.64e+05 ± 1.19e+05
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	6.31e+05 ± 1.10e+05
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	8.77e+05 ± 7.91e+04

- Tabelul 13B: Studiul 1 al modelului OVCAR-3. Nivelul de bioluminescență în ziua 20 după implantarea tumorii**

Anticorp (mg/kg)	Radianța medie [p/s/cm ² /sr] 20 zile după implantare (median ± SEM)
controlul ne-legării (0,5)	8,63e+06 ± 1,45e+06
CD3-controlul legării (0,5)	9,94e+06 ± 1,08e+06
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	9,37e+02 ± 9,62e+02
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	2,36e+04 ± 1,28e+06
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	6,51e+06 ± 1,60e+06

- 15 **Tabelul 13C: Studiul 1 al modelului OVCAR-3. Modificarea plierii BLI între Ziua 6 și Ziua 20 după implantarea tumorii**

Anticorp (mg/kg)	Modificarea plierii în Radianța medie [p/s/cm ² /sr] de la ziua 6 la ziua 20 după implantare (median ± SD)
controlul ne-legării (0,5)	9.5 ± 1.9
CD3-controlul legării (0,5)	15.6 ± 6.7
BSMUC16/CD3-001 (0,5)	-1.00 ± 0.00
BSMUC16/CD3-001 (0,1)	1.2 ± 4.7
BSMUC16/CD3-001 (0,01)	5.6 ± 4.2

- Tabelul 13D: Studiul 2 al modelului OVCAR-3. Nivelul de bioluminescență în ziua 4 după implantarea tumorii**

Anticorp (mg/kg)	Radianța medie [p/s/cm ² /sr] 4 zile după implantare (median ± SEM)
controlul ne-legării (5)	1.54e+05 ± 9.93e+03
CD3-controlul legării (5)	1.34e+05 ± 1.55e+04
BSMUC16/CD3-005 (5)	1.54e+05 ± 1.03e+04
BSMUC16/CD3-005 (1)	1.38e+05 ± 4.65e+03
BSMUC16/CD3-005 (0.5)	1.31e+05 ± 4.03e+03

BSMUC16/CD3-005 (0.1)	1.53e+05 ± 1.93e+04
-----------------------	---------------------

Tabelul 13E: Studiul 2 al modelului OVCAR-3. Nivelul de bioluminescență în ziua 25 după implantarea tumorii

Anticorp (mg/kg)	Radianța medie [p/s/cm ² /sr] 25 zile după implantare (median ± SEM)
controlul ne-legării (5)	7.20e+06 ± 8.91e+05
CD3-controlul legării (5)	6.15e+06 ± 7.26e+05
BSMUC16/CD3-005 (5)	1.52e+03 ± 4.86e+05
BSMUC16/CD3-005 (1)	6.99e+03 ± 6.23e+03
BSMUC16/CD3-005 (0.5)	2.23e+03 ± 2.35e+05
BSMUC16/CD3-005 (0.1)	7.63e+06 ± 1.83e+06

Tabelul 13F: Studiul 2 al modelului OVCAR-3. Schimbarea plierii în BLI între Ziua 4 și Ziua 25 după implantarea tumorii

Anticorp (mg/kg)	Modificarea plierii în Radianța medie [p/s/cm ² /sr] de la ziua 4 la ziua 25 după implantare (median ± SD)
controlul ne-legării (5)	46.8 ± 20.6
CD3-controlul legării (5)	55.0 ± 14.7
BSMUC16/CD3-005 (5)	2.5 ± 8.5
BSMUC16/CD3-005 (1)	-0.9 ± 0.1
BSMUC16/CD3-005 (0.5)	0.7 ± 3.6
BSMUC16/CD3-005 (0.1)	45.4 ± 35.7

Tabelul 13G: modelul ID8-VEGF/huMUC16. Dimensiunea tumorii (mm³) în ziua 47

Începutul tratamentului	Anticorp (mg)	Dimensiunea tumorii (mm ³) la ziua 47 (mean SEM)
Ziua 0	CD3-controlul legării (100)	827.5 ± 223.5
Ziua 0	BSMUC16/CD3-001 (100)	51.2 ± 51.2
Ziua 10	BSMUC16/CD3-001 (100)	273.8 ± 92.36

Exemplul de referință 1: Prepararea și caracterizarea conjugatului

Toți anticorpii monoclonali au fost exprimați în celule CHO și purificați prin proteina A. Un control izotip a fost, de asemenea, preparat într-un mod similar. Anticorpul de control izotip care nu se leagă a fost derivat dintr-un antigen imunologic care nu are nicio legătură cu oncologia.

Anticorpul (10 mg/ml) în HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, a fost tratat cu ditiotritol 1 mM la 37 °C timp de 30 min. După filtrarea pe gel (G-25, pH 4,5 acetat de sodiu), unul dintre derivații de sarcină utilă maleimido linker **Compusul 7** sau **Compusul 10** (vezi Tabelul 14) (1,2 echivalenți/grup SH) în DMSO (10 mg/ml) a fost adăugat la anticorpul redus și amestecul ajustat la pH 7,0 cu 1 M HEPES (pH 7,4). **Compusul 7** și **Compusul 10** și metodele de producere a compușilor sunt descrise în Publicația PCT Nr. WO2014/145090, publicată la 18 septembrie 2014 și, respectiv, în Publicația PCT Nr. WO2016/160615, publicată la 6 octombrie 2016, fiecare dintre care este încorporat în întregime aici prin referire. După 1 oră, reacția a fost stinsă cu N-etil maleimidă în exces. Conjugatele au fost purificate prin cromatografie de excludere dimensională și filtrate steril. Concentrațiile de proteine și încărcături utile de linker au fost determinate prin analiză spectrală UV. HPLC de excludere a mărimii a stabilit că toți conjugății utilizați au fost >95% monomelici.

Randamentele sunt raportate în Tabelul 14 pe baza determinărilor de proteine. Toți anticorpii conjugăți au fost analizați prin UV pentru valorile de încărcare a sarcinii utile de linker conform Hamblett și colab., Cancer Res 2004 107063. Rezultatele sunt rezumate în Tabelul 14.

Un conjugat care cuprinde **Compusul 60** poate fi preparat folosind o metodă similară. **Compusul 60** și metodele de producere a compusului sunt descrise în Publicația PCT nr. WO2016/160615 (Exemplul 20), publicat pe 6 octombrie 2016, care este încorporat în întregime aici ca referință. **Compusul 60** este *Maytansin-N-metil-L-alanină-(3-metoxi-4-amino)benzamido-Cit-Val-Cap-Mal*.

Tabelul 14: Rezumatul sarcinii utile (medicament chimiotoxic) și parametrii

Compus	ϵ 252 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)	ϵ 280 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)
7 [<i>Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanină-propanamidil-3-N-metil- N-[4-(amino-citrullină-valină-hexanamidă-6-maleimidil)benzil]</i> carbamat]	50600	8100
10 [<i>Maitansin-N-metil-L-alanină-4-aminobenzamidă-citrullină-valină-caprolil-6-maleimidil]</i>	45990	20600
Anticorp	ϵ 252 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)	ϵ 280 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)
H1H9519N	83995	235280
H1H9521N	85564	232050
Control Izotip	75113	218360
Conjugat de Anticorp	Sarcina: Anticorp (UV)	Randament %
H1H9519N-7	3.5	40
H1H9521N-7	3.6	40
H1H9521N-10	3.0	40
Control Izotip -7	3.0	60
Control Izotip -10	3.4	60

Exemplul de referință 2: Conjugății de medicament cu anticorpi anti-MUC16 sunt inhibitori potenți ai creșterii tumorii în modelele de xenogrefă *in vivo* pentru cancerul de prostată MUC16-pozitiv

Pentru a determina eficacitatea *in vivo* a anticorpilor anti-MUC16 conjugați la **Compusul 7** și **Compusul 10**, au fost efectuate studii pe șoareci imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer ovarian MUC16 pozitive.

Pentru aceste studii, șoarecii SCID femele (Taconic, Hudson NY) au fost implantați cu celule OVCAR3 [NIH:OVCAR-3 (OVCAR3, ATCC HTB-161)] transfectate cu luciferază (OVCAR3/luc) care exprimă endogen MUC16. Pentru tumorile intraperitoneale (IP), șoarecii au fost randomizați în grupuri de tratament și dozați fie cu anticorpi conjugați cu medicament anti-MUC16 (vezi Exemplul de referință 1), cu un anticorp conjugat care nu se leagă, fie cu vehicul după detectarea semnalului luminescent al tumorii. Pentru xenogrefele subcutanate (SC), odată ce tumorile au atins un volum mediu de 200 mm³ (-Ziua 16), șoarecii au fost randomizați în grupuri de tratament și dozați fie cu anticorpi conjugați cu medicament anti-MUC16, fie cu un anticorp conjugat nelegator, fie cu vehicul. În aceste studii *in vivo*, anticorpul au fost dozați și tumorile au fost apoi monitorizate până când s-a dezvoltat ascită sau s-a atins o dimensiune medie a tumorii de aproximativ 1200 mm³ în cohorta dozată numai cu vehicul. În acest moment a fost calculată inhibarea creșterii tumorii.

Într-un studiu inițial intraperitoneal (IP), anticorpul anti-MUC16 exemplari conjugați cu **Compusul 7** au fost examinați pentru eficacitatea în reducerea semnalului luminescent OVCAR3/luc. Șoarecii au primit patru doze o dată pe săptămână de anti-MUC16 și ADC-uri de control la 85 μg/kg de echivalent medicament pe baza raporturilor medicament ADC:anticorp. După cum este rezumat în Tabelul 15A, H1H9519N-**Compusul 7** și H1H9521N-**Compusul 7** au inhibat puternic creșterea tumorii ascitice. Aceste ADC anti-MUC16 au redus eficient dimensiunea tumorii, cu o reducere de 100% a

luminiscentei tumorii în raport cu controlul vehiculului. Controlul ADC nu a mediat nicio inhibare a creșterii tumorii subcutanate OVCAR3/luc.

Un studiu suplimentar care evaluează eficacitatea ADC-urilor anti-MUC16 împotriva tumorii OVCAR3/luc subcutanate (SC) este rezumat în Tabelul 15B. Șoarecii au primit patru doze o dată pe săptămână de anti-MUC16 și ADC-uri de control la 85 µg/kg de echivalent medicament pe baza raporturilor ADC medicament:anticorp. Când au fost conjugate cu **Compusul 7**, ADC-urile MUC16 H1H9519N- **Compusul 7** și H1H9521N- **Compusul 7** au produs din nou un efect anti-tumoral semnificativ; de data aceasta împotriva tumorilor subcutanate OVCAR3/luc. În consecință, aceste ADC au mediat o inhibare de 100% și, respectiv, 109% a creșterii tumorii. Controlul ADC nu a mediat nicio inhibare a creșterii tumorii subcutanate OVCAR3/luc.

Într-un al treilea studiu, eficacitatea anticorpului anti-MUC16 H1H9521 N conjugat cu medicamentul linker **Compusul 10** a fost evaluată în modelul de tumoră IP OVCAR3/luc. Șoarecii au primit doze unice de anti-MUC16 și ADC-uri de control la 85 µg/kg, 170 µg/kg și 340 µg/kg de echivalent medicament pe baza raporturilor medicament ADC:anticorp. După cum este rezumat în Tabelul 15C, H1H9519N-**10** a inhibat puternic creșterea tumorii ascitice. Dozele de H1H9519N-**Compusul 10** au dus la o inhibare de 99-100 % a luminiscentei tumorii în raport cu vehiculul de control. S-a observat o anumită inhibare cu Control ADC utilizând **Compusul 10**, deși aceasta a fost mai moderată decât cea observată după anti-MUC16 H1H9519N-**Compusul 10**.

Tabelul 15A: Inhibarea creșterii tumorii OVCAR3/luc IP în ziua 49 la șoarecii SCID tratați cu anticorpi anti-MUC16 conjugăți la compusul 7

Grup de tratament	Strălucirea medie a tumorii finale (media ± SEM)	Inhibarea medie a creșterii tumorii (%)
Vehicul	16469750 ± 10679335	0
Control- Compound 7 85 µg/kg	16813750 ± 4026065	-2
H1H9519N- Compound 7 85 µg/kg	111254 ± 187288	100
H1H9521N- Compound 7 85 µg/kg	110413 ± 161353	100

Tabelul 15B: Inhibarea creșterii tumorii OVCAR3/luc SC în ziua 37 la șoarecii SCID tratați cu anticorpi anti-MUC16 conjugăți la compusul 7

Grup de tratament	Strălucirea medie a tumorii finale (media ± SEM)	Inhibarea medie a creșterii tumorii (%)
Vehicul	1210 ± 426	0
Control- Compound 7 85 µg/kg	1737 ± 391	-51
H1H9519N- Compound 7 85 µg/kg	187 ± 269	100
H1H9521N- Compound 7 85 µg/kg	89 ± 97	109

Tabelul 15C: Inhibarea creșterii tumorii OVCAR3/luc IP în ziua 49 la șoarecii SCID tratați cu anticorpi anti-MUC16 conjugăți la compusul 10

Grup de tratament	Strălucirea medie a tumorii finale (media ± SEM)	Inhibarea medie a creșterii tumorii (%)
Vehicul	29211000 ± 23504780	0
Control- Compound 10 85 µg/kg	17332625 ± 14346694	41
Control- Compound 10 170 µg/kg	32075000 ± 15623403	-10
Control- Compound 10 340 mg/kg	22882350 ± 18771913	22
H1H9521N- Compound 10 85 µg/kg	574285 ± 306844	99
H1H9521N- Compound 10 170 µg/kg	236037 ± 226948	100
H1H9521N- Compound 10 340 µg/kg	26472 ± 25079	101

Exemplul : Generarea de anticorpi anti-CD3

Anticorpii anti-CD3 au fost obținuți prin imunizarea unui șoarece modificat cuprinzând ADN care codifică regiuni variabile ale lanțului greu de imunoglobuline umane și ale lanțului ușor kappa cu celule care exprimă CD3 sau cu ADN care codifică CD3. Răspunsul imun al anticorpilor a fost monitorizat printr-un imunotest specific CD3. Când s-a obținut un răspuns imun dorit, splenocitele au fost recoltate și fuzionate cu celule de mielom de șoarece pentru a-și păstra viabilitatea și a forma linii celulare de hibridom. Liniile celulare de hibridom au fost verificate și selectate pentru a identifica liniile celulare care produc anticorpi specifici CD3. Folosind această tehnică au fost obținuți mai mulți anticorpi himeric anti-CD3 (adică anticorpi care posedă domenii variabile umane și domenii constante de șoarece). În plus, câțiva anticorpi anti-CD3 complet umani au fost izolați direct din celulele B pozitive pentru antigen fără fuziune cu celulele de mielom, așa cum este descris în US 2007/0280945A1.

Anumite proprietăți biologice ale anticorpilor anti-CD3 exemplificativi generați în conformitate cu metodele din acest exemplu sunt descrise în detaliu în exemplele de aici.

Exemplul 10: Secvențe de aminoacizi și acizi nucleici din regiunea variabilă a lanțului greu și ușor

Tabelul 16 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor și CDR-urile anticorpilor anti-CD3 selectați ai dezvoltării. Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 17. Metodele de producere a anticorpilor anti-CD3 dezvoltate aici pot fi găsite de asemenea în publicația SUA 20014/0088295.

Tabelul 16: Identificatori de secvență de aminoacizi

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	402	404	406	408	410	412	414	416
H1M2692N	418	420	422	424	426	428	430	432
H1M3542N	434	436	438	440	442	444	446	448
H1M3544N	450	452	454	456	458	460	462	464
H1M3549N	466	468	470	472	474	476	478	480
H1M3613N	482	484	486	488	490	492	494	496
H2M2689N	498	500	502	504	506	508	510	512
H2M2690N	514	516	518	520	522	524	526	528
H2M2691N	530	532	534	536	538	540	542	544
H2M2704N	546	548	550	552	554	556	558	560
H2M2705N	562	564	566	568	570	572	574	576
H2M2706N	578	580	582	584	586	588	590	592
H2M2707N	594	596	598	600	602	604	606	608
H2M2708N	610	612	614	616	618	620	622	624
H2M2709N	626	628	630	632	634	636	638	640
H2M2710N	642	644	646	648	650	652	654	656
H2M2711N	658	660	662	664	666	668	670	672
H2M2774N	674	676	678	680	682	684	686	688
H2M2775N	690	692	694	696	698	700	702	704
H2M2776N	706	708	710	712	714	716	718	720
H2M2777N	722	724	726	728	730	732	734	736
H2M2778N	738	740	742	744	746	748	750	752
H2M2779N	754	756	758	760	762	764	766	768
H2M2789N	770	772	774	776	778	780	782	784
H2M2862N	786	788	790	792	794	796	798	800

MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

68

H2M2885N	802	804	806	808	810	812	814	816
H2M2886N	818	820	822	824	826	828	830	832
H2M3540N	834	836	838	840	842	844	846	848
H2M3541N	850	852	854	856	858	860	862	864
H2M3543N	866	868	870	872	874	876	878	880
H2M3547N	882	884	886	888	890	892	894	896
H2M3548N	898	900	902	904	906	908	910	912
H2M3563N	914	916	918	920	922	924	926	928
SEQ ID NOs:								
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H5751P	930	932	934	936	938	940	942	944
H1H5752P	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5753B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5754B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5755B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008
H1H5756B	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5757B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040
H1H5758B	1042	1044	1046	1048	1050	1052	1054	1056
H1H5761P	1058	1060	1062	1064	1066	1068	1070	1072
H1H5763P	1074	1076	1078	1080	1082	1084	1086	1088
H1H5764P	1090	1092	1094	1096	1098	1100	1102	1104
H1H5769P	1106	1108	1110	1112	1114	1116	1118	1120
H1H5771P	1122	1124	1126	1128	1130	1132	1134	1136
H1H5772P	1138	1140	1142	1144	1146	1148	1150	1152
H1H5777P	1154	1156	1158	1160	1162	1164	1166	1168
H1H5778P	1170	1172	1174	1176	1178	1180	1182	1184
H1H5780P	1186	1188	1190	1192	1194	1196	1198	1200
H1H 5781P	1202	1204	1206	1208	1210	1212	1214	1216
H1H5782P	1218	1220	1222	1224	1226	1228	1230	1232
H1H5785B	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1246	1248
H1H5786B	1250	1252	1254	1256	1258	1260	1262	1264
H1H5788P	1266	1268	1270	1272	1274	1276	1278	1280
H1H5790B	1282	1284	1286	1288	1290	1292	1294	1296
H1H5791B	1298	1300	1302	1304	1306	1308	1310	1312
H1H5792B	1314	1316	1318	1320	1322	1324	1326	1328
H1H5793B	1330	1332	1334	1336	1338	1340	1342	1344
H1H5795B	1346	1348	1350	1352	1354	1356	1358	1360
H1H5796B	1362	1364	1366	1368	1370	1372	1374	1376
H1H5797B	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392
H1H5798B	1394	1396	1398	1400	1402	1404	1406	1408

H1H5799P	1410	1412	1414	1416	1418	1420	1422	1424
H1H5801B	1426	1428	1430	1432	1434	1436	1438	1440
H1H7194B	1442	1444	1446	1448	1634	1636	1638	1640
H1H7195B	1450	1452	1454	1456	1634	1636	1638	1640
H1H7196B	1458	1460	1462	1464	1634	1636	1638	1640
H1H7198B	1466	1468	1470	1472	1634	1636	1638	1640
H1H7203B	1474	1476	1478	1480	1634	1636	1638	1640
H1H7204B	1482	1484	1486	1488	1634	1636	1638	1640
H1H7208B	1490	1492	1494	1496	1634	1636	1638	1640

	SEQ ID NOs:							
Denumie anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H7211B	1498	1500	1502	1504	1634	1636	1638	1640
H1H7221B	1506	1508	1510	1512	1634	1636	1638	1640
H1H7223B	1514	1516	1518	1520	1634	1636	1638	1640
H1H7226B	1522	1524	1526	1528	1634	1636	1638	1640
H1H7232B	1530	1532	1534	1536	1634	1636	1638	1640
H1H7233B	1538	1540	1542	1544	1634	1636	1638	1640
H1H7241B	1546	1548	1550	1552	1634	1636	1638	1640
H1H7242B	1554	1556	1558	1560	1634	1636	1638	1640
H1H7250B	1562	1564	1566	1568	1634	1636	1638	1640
H1H7251B	1570	1572	1574	1576	1634	1636	1638	1640
H1H7254B	1578	1580	1582	1584	1634	1636	1638	1640
H1H7258B	1586	1588	1590	1592	1634	1636	1638	1640
H1H7269B	1594	1596	1598	1600	1634	1636	1638	1640
H1H7279B	1602	1604	1606	1608	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G	1610	1612	1614	1616	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G3	1618	1620	1622	1624	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G5	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640

Tabelul 17: Identificatori de secvență de acid nucleic

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	401	403	405	407	409	411	413	415
H1M2692N	417	419	421	423	425	427	429	431
H1M3542N	433	435	437	439	441	443	445	447
H1M3544N	449	451	453	455	457	459	461	463
H1M3549N	465	467	469	471	473	475	477	479
H1M3613N	481	483	485	487	489	491	493	495
H2M2689N	497	499	501	503	505	507	509	511
H2M2690N	513	515	517	519	521	523	525	527

MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

70

H2M2691N	529	531	533	535	537	539	541	543
H2M2704N	545	547	549	551	553	555	557	559
H2M2705N	561	563	565	567	569	571	573	575
H2M2706N	577	579	581	583	585	587	589	591
H2M2707N	593	595	597	599	601	603	605	607
H2M2708N	609	611	613	615	617	619	621	623
H2M2709N	625	627	629	631	633	635	637	639

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M2710N	641	643	645	647	649	651	653	655
H2M2711N	657	659	661	663	665	667	669	671
H2M2774N	673	675	677	679	681	683	685	687
H2M2775N	689	691	693	695	697	699	701	703
H2M2776N	705	707	709	711	713	715	717	719
H2M2777N	721	723	725	727	729	731	733	735
H2M2778N	737	739	741	743	745	747	749	751
H2M2779N	753	755	757	759	761	763	765	767
H2M2789N	769	771	773	775	777	779	781	783
H2M2862N	785	787	789	791	793	795	797	799
H2M2885N	801	803	805	807	809	811	813	815
H2M2886N	817	819	821	823	825	827	829	831
H2M3540N	833	835	837	839	841	843	845	847
H2M3541N	849	851	853	855	857	859	861	863
H2M3543N	865	867	869	871	873	875	877	879
H2M3547N	881	883	885	887	889	891	893	895
H2M3548N	897	899	901	903	905	907	909	911
H2M3563N	913	915	917	919	921	923	925	927
H1H5751P	929	931	933	935	937	939	941	943
H1H5752P	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5753B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5754B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5755B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007
H1H5756B	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023
H1H5757B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H5758B	1041	1043	1045	1047	1049	1051	1053	1055
H1H5761P	1057	1059	1061	1063	1065	1067	1069	1071
H1H5763P	1073	1075	1077	1079	1081	1083	1085	1087
H1H5764P	1089	1091	1093	1095	1097	1099	1101	1103
H1H5769P	1105	1107	1109	1111	1113	1115	1117	1119

MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

71

H1H5771P	1121	1123	1125	1127	1129	1131	1133	1135
H1H5772P	1137	1139	1141	1143	1145	1147	1149	1151
H1H5777P	1153	1155	1157	1159	1161	1163	1165	1167
H1H5778P	1169	1171	1173	1175	1177	1179	1181	1183
H1H5780P	1185	1187	1189	1191	1193	1195	1197	1199
H1H5781P	1201	1203	1205	1207	1209	1211	1213	1215
H1H5782P	1217	1219	1221	1223	1225	1227	1229	1231

	SEQ ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H5785B	1233	1235	1237	1239	1241	1243	1245	1247
H1H5786B	1249	1251	1253	1255	1257	1259	1261	1263
H1H5788P	1265	1267	1269	1271	1273	1275	1277	1279
H1H5790B	1281	1283	1285	1287	1289	1291	1293	1295
H1H5791B	1297	1299	1301	1303	1305	1307	1309	1311
H1H5792B	1313	1315	1317	1319	1321	1323	1325	1327
H1H5793B	1329	1331	1333	1335	1337	1339	1341	1343
H1H5795B	1345	1347	1349	1351	1353	1355	1357	1359
H1H5796B	1361	1363	1365	1367	1369	1371	1373	1375
H1H5797B	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391
H1H5798B	1393	1395	1397	1399	1401	1403	1405	1407
H1H5799P	1409	1411	1413	1415	1417	1419	1421	1423
H1H5801B	1425	1427	1429	1431	1433	1435	1437	1439
H1H7194B	1441	1443	1445	1447	1633	1635	1637	1639
H1H7195B	1449	1451	1453	1455	1633	1635	1637	1639
H1H7196B	1457	1459	1461	1463	1633	1635	1637	1639
H1H7198B	1465	1467	1469	1471	1633	1635	1637	1639
H1H7203B	1473	1475	1477	1479	1633	1635	1637	1639
H1H7204B	1481	1483	1485	1487	1633	1635	1637	1639
H1H7208B	1489	1491	1493	1495	1633	1635	1637	1639
H1H7211B	1497	1499	1501	1503	1633	1635	1637	1639
H1H7221B	1505	1507	1509	1511	1633	1635	1637	1639
H1H7223B	1513	1515	1517	1519	1633	1635	1637	1639
H1H7226B	1521	1523	1525	1527	1633	1635	1637	1639
H1H7232B	1529	1531	1533	1535	1633	1635	1637	1639
H1H7233B	1537	1539	1541	1543	1633	1635	1637	1639
H1H7241B	1545	1547	1549	1551	1633	1635	1637	1639
H1H7242B	1553	1555	1557	1559	1633	1635	1637	1639
H1H7250B	1561	1563	1565	1567	1633	1635	1637	1639
H1H7251B	1569	1571	1573	1575	1633	1635	1637	1639

H1H7254B	1577	1579	1581	1583	1633	1635	1637	1639
H1H7258B	1585	1587	1589	1591	1633	1635	1637	1639
H1H7269B	1593	1595	1597	1599	1633	1635	1637	1639
H1H7279B	1601	1603	1605	1607	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G	1609	1611	1613	1615	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G3	1617	1619	1621	1623	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G5	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639

La anticorpi se face referire în mod obișnuit aici conform următoarei nomenclaturi: prefixul Fc (de ex. „H1H”, „M1M”, „H2M” etc.), urmat de un identificator numeric (de exemplu, „2712”, „2692” etc., după cum se arată în Tabelul 1), urmat de un „P”, „N” sau sufixul „B”. Astfel, conform acestei nomenclaturi, un anticorp poate fi denumit aici, de exemplu, "H1H2712N", "H1M2692N", "H2M2689N" etc.

Prefixele H1H, H1M și H2M de pe denumirile anticorpilor utilizate aici indică izotipul particular al regiunii Fc a anticorpului. De exemplu, un anticorp „H1H” are un Fc IgG1 uman, un anticorp „H1M” are un Fc IgG1 de șoarece și un anticorp „H2M” are un Fc IgG2 de șoarece (toate regiunile variabile sunt complet umane, așa cum este indicat de prima „H” în denumirea anticorpului). După cum va fi apreciat de o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, un anticorp având un anumit izotip Fc poate fi convertit într-un anticorp cu un izotip Fc diferit (de exemplu, un anticorp cu un Fc IgG1 de șoarece poate fi convertit într-un anticorp cu un IgG4 uman etc.), dar în orice caz, domeniile variabile (inclusiv CDR-urile) - care sunt indicate de identificatorii numerici prezentați în Tabelul 1 - vor rămâne aceleași, iar proprietățile de legare sunt de așteptat să fie identice sau substanțial similare indiferent de natura domeniului Fc.

Tabelele 18 și 19 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi pentru regiunile variabile ale lanțului greu (Tabelul 18) și regiunile variabile ale lanțului ușor (Tabelul 19) și CDR-urile corespunzătoare acestora, ale HCVR și LCVR-uri suplimentare anti-CD3 utile în anti-MUC16 x anti-anticorpi bispecifici CD3 ai dezvoltării.

Tabelul 18 (Secvențe de aminoacizi din regiunea variabilă a lanțului greu)

	SEQ ID NOs			
Identificator al lanțului greu	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1642	1644	1646	1648
CD3-VH-B	1658	1660	1662	1664
CD3-VH-C	1674	1676	1678	1680
CD3-VH-D	1690	1692	1694	1696
CD3-VH-E	1706	1708	1710	1712
CD3-VH-F#	1721	1722	1723	1724

Tabelul 19 (Secvențe de aminoacizi din regiunea variabilă a lanțului ușor)

	SEQ ID NOs			
Identificator al lanțului ușor	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1650	1652	1654	1656
CD3-VL-B	1666	1668	1670	1672
CD3-VL-C	1682	1684	1686	1688
CD3-VL-D	1698	1700	1702	1704
CD3-VL-E	1714	1716	1718	1720
CD3-VL-F#	1725	1726	1727	1728

Regiunile variabile ale lanțului greu și ușor ale CD3-VH-F și CD3-VL-F au fost derivate din anticorpii anti-CD3 desemnați „L2K” așa cum este prezentat în WO2004/106380.

În plus, Tabelele 20 și 21 stabilesc identificatorii de secvență pentru secvențele de nucleotide care codifică regiunile variabile ale lanțului greu (Tabelul 20) și regiunile variabile ale lanțului ușor (Tabelul 21) și CDR-urile corespunzătoare ale HCVR-urilor și LCVR-urilor suplimentare anti-CD3 utile în anticorpii bispecfici anti-MUC16 x anti-CD3 ai dezvoltării.

Tabelul 20 (Secvențe de nucleotide care codifică secvențe de regiune variabilă a lanțului greu)

	SEQ ID NOs			
Identificator al lanțului greu	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1641	1643	1645	1647
CD3-VH-B	1657	1659	1661	1663
CD3-VH-C	1673	1675	1677	1679
CD3-VH-D	1689	1691	1693	1695
CD3-VH-E	1705	1707	1709	1711

Tabelul 21 (Secvențe de nucleotide care codifică secvențele de regiune variabilă a lanțului ușor)

	SEQ ID NOs			
Identificator al lanțului ușor	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1649	1651	1653	1655
CD3-VL-B	1665	1667	1669	1671
CD3-VL-C	1681	1683	1685	1687
CD3-VL-D	1697	1699	1701	1703
CD3-VL-E	1713	1715	1717	1719

Construcții de control utilizate în următoarele exemple

Diverse construcții de control (anticorpi anti-CD3) au fost incluse în cele ce urmează experimente în scopuri comparative: "OKT-3", un anticorp monoclonal de șoarece împotriva antigenelor de suprafață a celulelor T umane, disponibil de la American Type Culture Collection (ATCC) sub catalogul nr. CRL-8001; și "SP34", un anticorp monoclonal de șoarece disponibil comercial, obținut, de exemplu, de la Biologend, San Diego, CA (Cat. Nr. 302914) sau BD Pharmagen, Cat. 55052, reactiv împotriva lanțului epsilon al complexului T3 de pe celulele limfocitelor T umane.

Exemplul 13: Generarea de anticorpi suplimentari anti-CD3

Următoarele proceduri au avut ca scop identificarea anticorpilor care au recunoscut în mod specific CD3 (co-receptor de celule T) ca antigen.

Un grup de anticorpi anti-CD3 a fost obținut de la un șoarece modificat genetic. Pe scurt, șoarecii au fost imunizați cu un antigen CD3 și au generat celule B care au cuprins o diversitate de rearanjamente VH umane pentru a exprima un repertoriu divers de anticorpi specifici antigenului de înaltă afinitate. Anticorpii descriși în Tabelele 22-25 au aceeași secvență de lanț ușor de VK1-39JK5 (LCVR prezentat în SEQ ID NO: 1890).

Anticorpii generați au fost testați pentru legarea la antigenul CD3 uman și al maimuței cynomolgus într-un test de legare in vitro și, de ex. un anticorp CD3: CD3-VH-P desemnat (HCVR prezentat în SEQ ID NO: 1882) a fost identificat, printre alții, care s-a găsit că se leagă atât la CD3 uman, cât și la cynomolgus având o legare EC₅₀ între 1 și 40 nM (sau titrarea de legare a celulelor), așa cum s-a determinat într-o titrare FACS a celulelor Jurkat și, respectiv, a celulelor T cynomolgus. A se vedea, de asemenea, de exemplu, experimentele de legare FACS prezentate în Exemplul 13 și în PCT/US2016/044732 depus la 29 iulie 2016.

Resturile de aminoacizi ale liniei germinale ale CD3-VH-P au fost identificate ulterior (rearanjarea V-D-J pentru CD3-VH-P este IGHV3-9*01, IGHJ6*02, IGHD5-12*01) și un anticorp denumit „CD3-VH-G” a fost conceput pentru a conține doar cadre germinale. Alți derivați de anticorpi au fost modificați prin tehnici de clonare moleculară bine-cunoscute pentru a înlocui reziduurile de

aminoacizi într-o manieră treptată, pe baza diferențelor dintre secvența liniei germinale și secvența CD3-VH-P.

Fiecărui derivat de anticorp i se dă o desemnare a numărului „CD3-VH-G”. Vezi Tabelul 18.

În timp ce CD3-VH-G și alți anticorpi modificați și-au păstrat legarea așa cum s-a observat în testele FACS, câțiva anticorpi anti-CD3 s-au legat la CD3 uman sau cynomolgus in vitro cu legare slabă până la deloc măsurabilă, cum ar fi EC50 40 nM. Afinitățile de legare, cinetica de legare și alte proprietăți biologice pentru a elucida toxicitatea și profilurile farmacocinetice (pK) au fost investigate ulterior pentru anticorpi bispecfici care cuprind anticorpii anti-CD3 exemplificați generați în conformitate cu metodele din acest exemplu, sunt descrise în detaliu în exemplele de aici.

Exemplul 12: Regiunile variabile ale lanțului greu și ușor (secvențele de aminoacizi și acizi nucleici ale CDR-urilor)

Tabelul 22 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și CDR-urile anticorpilor anti-CD3 selectați ai dezvăluirii. Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 23.

Secvențele de aminoacizi și acid nucleic au fost determinate pentru fiecare secvență de lanț greu de anticorp. Fiecărui lanț greu de anticorp derivat din secvența liniei germinale (SEQ ID NO: 1910) i s-a atribuit o desemnare a numărului „G” pentru o nomenclatură consistentă. Tabelul 22 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și CDR-urile anticorpilor anti-CD3 modificați conform invenției. Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 23. Identificatorii secvenței de aminoacizi și acid nucleic ai regiunii variabile ale lanțului ușor și CDR-urile sunt de asemenea identificați mai jos în Tabelele 24 și, respectiv, 25.

Tabelul 22: Identificatori de secvență de aminoacizi cu lanț greu

Desemnarea anticorpului CD3-VH	SEQ ID NOs:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1730	1732	1734	1736
CD3-VH-G2	1738	1740	1742	1744
CD3-VH-G3	1746	1748	1750	1752
CD3-VH-G4	1754	1756	1758	1760
Desemnarea anticorpului CD3-VH	SEQ ID NOs:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G5	1762	1764	1766	1768
CD3-VH-G8	1770	1772	1774	1776
CD3-VH-G9	1778	1780	1782	1784
CD3-VH-G10	1786	1788	1790	1792
CD3-VH-G11	1794	1796	1798	1800
CD3-VH-G12	1802	1804	1806	1808
CD3-VH-G13	1810	1812	1814	1816
CD3-VH-G14	1818	1820	1822	1824
CD3-VH-G15	1826	1828	1830	1832
CD3-VH-G16	1834	1836	1838	1840
CD3-VH-G17	1842	1844	1846	1848
CD3-VH-G18	1850	1852	1854	1856
CD3-VH-G19	1858	1860	1862	1864
CD3-VH-G20	1866	1868	1870	1872
CD3-VH-G21	1874	1876	1878	1880
CD3-VH-P	1882	1884	1886	1888

Tabelul 23: Identificatori de secvență de acid nucleic cu lanț greu

Desemnarea anticorpului CD3-VH	SEQ ID NOs:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1729	1731	1733	1735
CD3-VH-G2	1737	1739	1741	1743
CD3-VH-G3	1745	1747	1749	1751
CD3-VH-G4	1753	1755	1757	1759
CD3-VH-G5	1761	1763	1765	1767
CD3-VH-G8	1769	1771	1773	1775
CD3-VH-G9	1777	1779	1781	1783
CD3-VH-G10	1785	1787	1789	1791
CD3-VH-G11	1793	1795	1797	1799
CD3-VH-G12	1801	1803	1805	1807
CD3-VH-G13	1809	1811	1813	1815
CD3-VH-G14	1817	1819	1821	1823
CD3-VH-G15	1825	1827	1829	1831
CD3-VH-G16	1833	1835	1837	1839
CD3-VH-G17	1841	1843	1845	1847
CD3-VH-G18	1849	1851	1853	1855
CD3-VH-G19	1857	1859	1861	1863
Desemnarea anticorpului CD3-VH	SEQ ID NOs:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G21	1873	1875	1877	1879
CD3-VH-P	1881	1883	1885	1887

Tabelul 24: Identificatori de secvență de aminoacizi a lanțului ușor

Desemnarea anticorpului	SEQ ID NOs:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1890	1892	1894	1896

5

Tabelul 25: Identificatori de secvență de acid nucleic al lanțului ușor

Desemnarea anticorpului	SEQ ID NOs:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1889	1891	1893	1895

Anticorpul de control 1 desemnat "CD3-L2K" a fost construit pe baza unui anticorp anti-CD3 cunoscut (adică, anticorpul anti-CD3 "L2K" așa cum este prezentat în WO2004/106380).

10 Anticorpul de control al izotipului, la care se face referire în exemplele de aici, este un anticorp cu izotip (IgG4 modificat) care interacționează cu un antigen irelevant, de exemplu Antigenul FelD1.

Exemplul 15: Studii in vitro și in vivo asupra anticorpilor monoclonali umani anti-CD3

Studiile in vivo și in vitro asupra anticorpilor monoclonali umani anti-CD3 au fost realizate așa cum este descris în publicația SUA 2014/0088295 publicată pe 27 martie 2014 și PCT/US2016/044732 depusă pe 29 iulie 2016, care sunt încorporate aici ca referință.

15 Unii anticorpi monoclonali umani anti-CD3 ai prezentei invenții leagă proteina CD3 heterodimerică solubilă, fie în formate de captare a anticorpilor, fie în formate de captare a antigenului, cu

afinitate ridicată. Proteina CD3 heterodimerică solubilă (hCD3-epsilon/hCD3-delta; SEQ ID NO: 1900/1901) a fost preparată fie cu o etichetă Fc umană (hFc-Adp/hFc; SEQ ID NO: 1931/1932), fie cu o etichetă Fc de șoarece (mFc-Adp/). mFc; SEQ ID NO: 1933/1934). Proteina CD3 heterodimerică a fost purificată folosind metoda descrisă în Davis și colab. (US2010/0331527).

Unii anticorpi monoclonali umani anti-CD3 ai invenției au legat celulele T umane și au indus proliferarea celulelor T. Unii anticorpi monoclonali umani anti-CD3 ai invenției au legat celulele T de maimuță CD2+CD4+ și au indus proliferarea acestora. Unii anticorpi monoclonali umani anti-CD3 au susținut uciderea mediată de celule T redirecționate prin interacțiunea Fc/FcR într-un test de ucidere a U937 pe bază de calceină. Uciderea observată, care se crede că depinde de Fc-ul anticorpului angajarea cu receptorul Fc pe celulele U937 care duce la gruparea CD3 pe celulele T adiacente, a fost oprită prin adăugarea de IgG umană nespecifică (datele nu sunt prezentate). O gamă largă de anticorpi bispecfici construiți cu variante de braț anti-CD3 descrise aici (în special brațele anti-CD3 bazate pe lanțul greu CD3-VH-P derivat din IGHV3-9*01, IGHJ6*02, IGHD5-12*01) activează celulele PBMC umane și PBMC de maimuță și prezintă activitate citotoxică pe liniile celulare care exprimă antigenul tumoral.

Exemplul de referință 3: Screening-ul și identificarea anticorpilor monoclonali anti-MUC16 adecvați pentru imunohistochimie (IHC) pe probe încorporate în parafină fixată cu formalină (FFPE).

Au fost identificate linii de celule tumorale umane cu niveluri cunoscute de exprimare a MUC16, fixate în formalină tamponată neutră 10% și încorporate în parafină. Aceste linii au fost folosite pentru a verifica diverși anticorpi anti-MUC16 pentru a identifica candidații pentru studiile IHC.

Liniile celulare au inclus următoarele linii celulare negative MUC16:

HT29 (Colon) și PC3/ATCC parental (Prostată); Liniile de celule pancreatice cu niveluri scăzute până la deloc de MUC16: Capanl (adenocarcinom pancreatic), HPAC (adenocarcinom pancreatic).

Liniile celulare care exprimă MUC16 endogen includ: OVCAR3 (ovarian) și PEO-1 (carcinom ovarian seros).

Liniile celulare transfectate au fost concepute după cum urmează: celulele PC3/ATCC (linia parentală de cancer de prostată) au fost transfectate pentru a genera linii celulare PC3/MUC16 „scurte” și PC3/MUC16 „înalte”. Ambele construcții includ domeniul C-terminal al MUC16 din aminoacizii 13.810-14.507 (din SEQ ID NO: 1899), iar acesta include o parte din domeniul SEA12, SEA13, SEA14, SEA15, SEA16, regiunea C-terminală non-SEA, regiunea transmembranară și domeniul citoplasmatic. În plus, celulele PC3/MUC înalte au aminoacizi N-terminali suplimentari 12783-13467 (din SEQ ID NO: 1899) care includ SEA5 (parțial) până la SEA9 și un linker scurt între domeniul SEA9 și începutul scurtului MUC16 construi.

Acest lucru permite diferențierea între anticorpii anti-MUC16 care se leagă în regiunea repetă și cei care se leagă la porțiunea „nub” a MUC16 adiacentă membranei după clivaj enzimatic și eliberare a regiunilor repetate (analog cu porțiunea CA125 a MUC16).

Toată colorarea a fost efectuată pe autostainer Ventana Discovery XT utilizând protocoale standard. Peletele celulare au fost deparafinate, recuperarea epitopului indusă de căldură a fost optimizată, biotina endogenă a fost blocată și a fost efectuată blocarea proteinelor. Anticorpii au fost aplicați manual la o concentrație inițială de 10μg/ml și au fost, de asemenea, titrați pentru a asigura specificitatea semnalului. S-a făcut comparație cu un anticorp anti-MUC16 disponibil comercial (OC-125), care este specific pentru regiunile repetate ale CA-125 (Roche, Ventana Catalog # 760-2610) și un control negativ (absența anticorpului primar). Detectarea a fost cu Donkey anti-șoarece-Biotin urmată de Streptavidin-Peroxidază de hrean. Conversia substratului, Di-amino Benzidine (DAB) a fost observată ca colorare maro.

Probele au fost contracolorate cu hematoxilină pentru a vizualiza nucleeele. Rezultatele experimentelor de colorare sunt prezentate în Tabelul 26 de mai jos.

MD/EP 3515487 T2 2023.11.30

77

Tabelul 26: Legarea anticorpilor anti-MUC16 la celulele MUC16 negative și la celulele care exprimă MUC16 sau porțiunile proximale ale membranei MUC16

[illegible]

- 5 Patru dintre anticorpii testați (H1M7130N, H2aM7128N, H2aM7131N și H2aM7138N) au prezentat legare pozitivă la celulele care exprimă porțiunea „nub” a MUC16 fără regiuni repetate (PC3/MUC16 scurt). Acești anticorpi sunt identificați ca „legători nub.”. Unul dintre anticorpii testați (H1M9519N) a arătat legare pozitivă la celulele care exprimă regiunile repetate ale MUC16 (PC3/MUC16 ridicat), dar legare negativă la celule care exprimă doar porțiunea „nub” a MUC16 (PC3/MUC16 scurt). Acest anticorp este identificat ca un "legător repetat", similar cu anticorpurile OC-125 disponibil comercial. Este de așteptat ca anticorpii testați să leagă țesuturi sau celule de origine diferită având proteinele exprimate și/sau fragmentele de proteine așa cum este descris aici.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2016/149368
- WO-A1-2017/053856

(57) Revendicări:

1. Un anticorp bispecific sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific MUC16 uman, în care al doilea domeniu de legare a antigenului cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32.

2. Anticorpul bispecific sau fragment de legare la antigen conform revendicării 1, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 18 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 26.

3. Anticorpul bispecific sau fragment de legare la antigen conform revendicării 1 sau 2, în care primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, cuprinzând secvențe de aminoacizi selectate dintre grupul constând din SEQ ID NO: 1732-1734-1736-28-30-32, 1764-1766-1768-28-30-32, 1780-1782-1784-28-30-32, 1788-1792-- 28-30-32 și 1868-1870-1872-28-30-32.

4. Anticorpul bispecific sau fragment de legare la antigen conform revendicării 3, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă CD3 uman cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1730 , 1762, 1778, 1786 și 1866, și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 26.

5. Anticorpul bispecific sau fragment de legare la antigen conform revendicării 3, în care primul domeniu de legare a antigenului cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 1732-1734 -1736-28-30-32 și al doilea domeniu de legare la antigen cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30 -32.

6. Anticorpul bispecific sau fragment de legare la antigen conform revendicării 3, în care primul domeniu de legare a antigenului cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 1868-1870 -1872-28-30-32 și al doilea domeniu de legare a antigenului cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO: 20-22-24-28-30 -32.

7. Anticorpul bispecific conform revendicării 5, în care primul domeniu de legare la antigen cuprinde un HCVR care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1730 și un LCVR cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 26 și în care al doilea antigen -domeniul de legare cuprinde un HCVR care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 18 și un LCVR cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 26.

8. Anticorpul bispecific conform revendicării 6, în care primul domeniu de legare a antigenului cuprinde un HCVR care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 1866 și un LCVR cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 26 și în care al doilea antigen -domeniul de legare cuprinde un HCVR care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 18 și un LCVR cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 26.

9. Anticorpul bispecific conform revendicării 7, care cuprinde un prim braț de legare care cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1961 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960 și un al doilea braț de legare cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1959 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960.

10. Anticorpul bispecific conform revendicării 8, care cuprinde un prim braț de legare cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1962 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960 și un al doilea braț de legare cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1959 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1960.

11. O compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul bispecific sau fragmentul de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-10 și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic.

12. Anticorpul bispecific sau fragmentul de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-10, sau compoziția farmaceutică conform revendicării 11, pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer care exprimă MUC16.

13. Anticorpul bispecific sau fragmentul de legare la antigen, sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 12, în care cancerul este selectat din grupul constând din cancer ovarian, cancer de sân, cancer pancreatic, cancer pulmonar fără celule mici, colangiocarcinom intrahepatic, tip de formare de masă, adenocarcinom al colului uterin și adenocarcinom al tractului gastric.

14. Anticorpul bispecific sau fragmentul de legare la antigen, sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 12, în care cancerul este cancer ovarian.

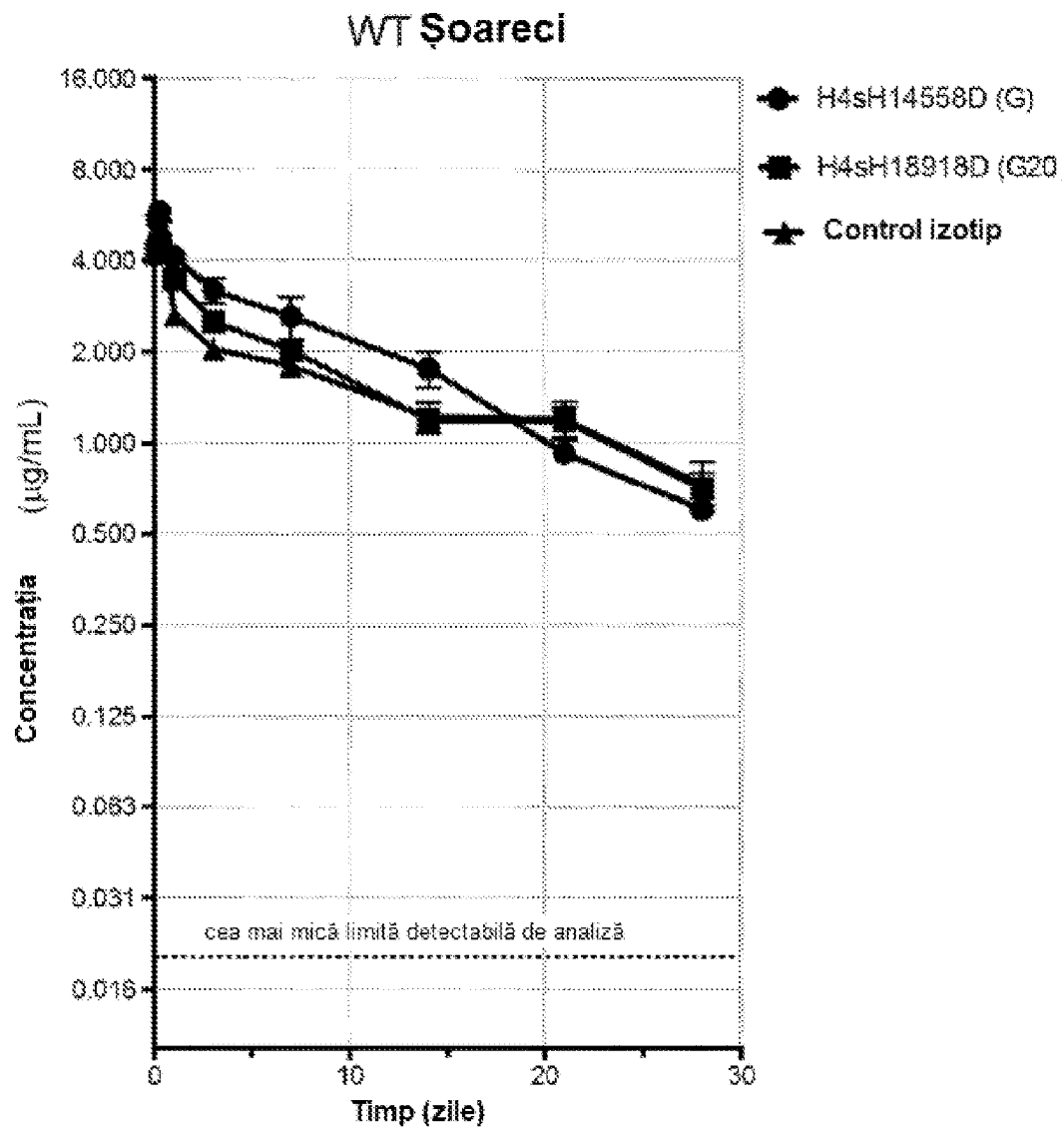


FIG. 1

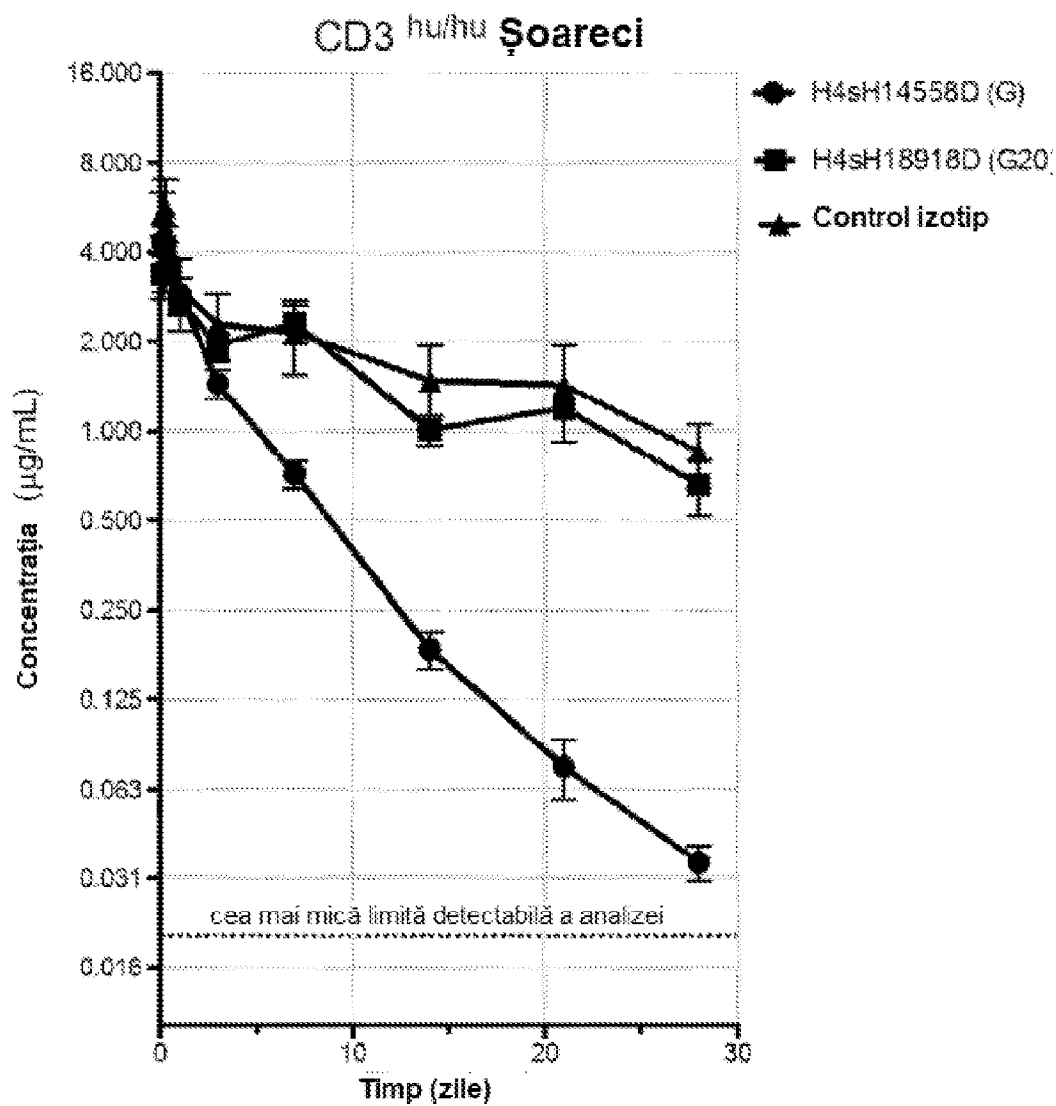


FIG. 2

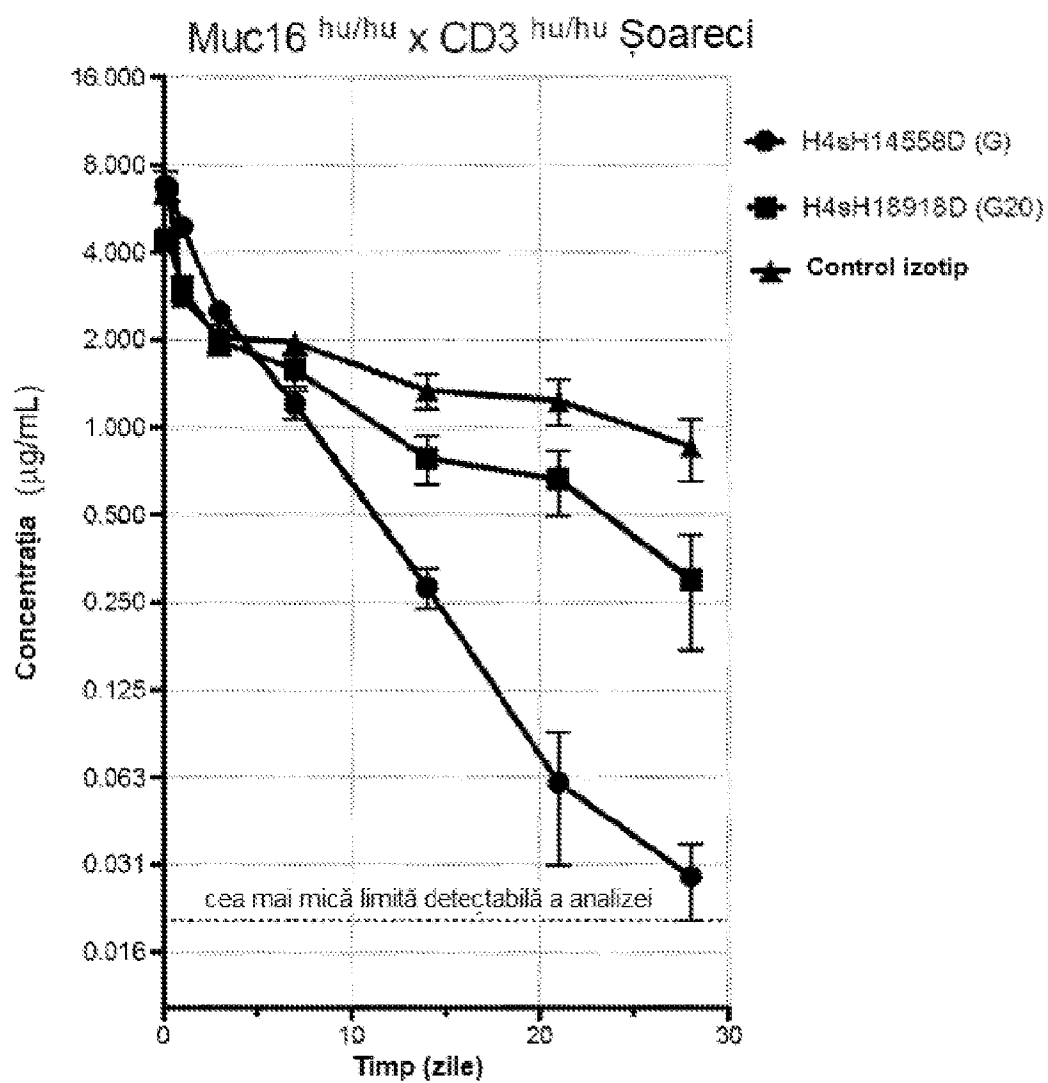


FIG. 3

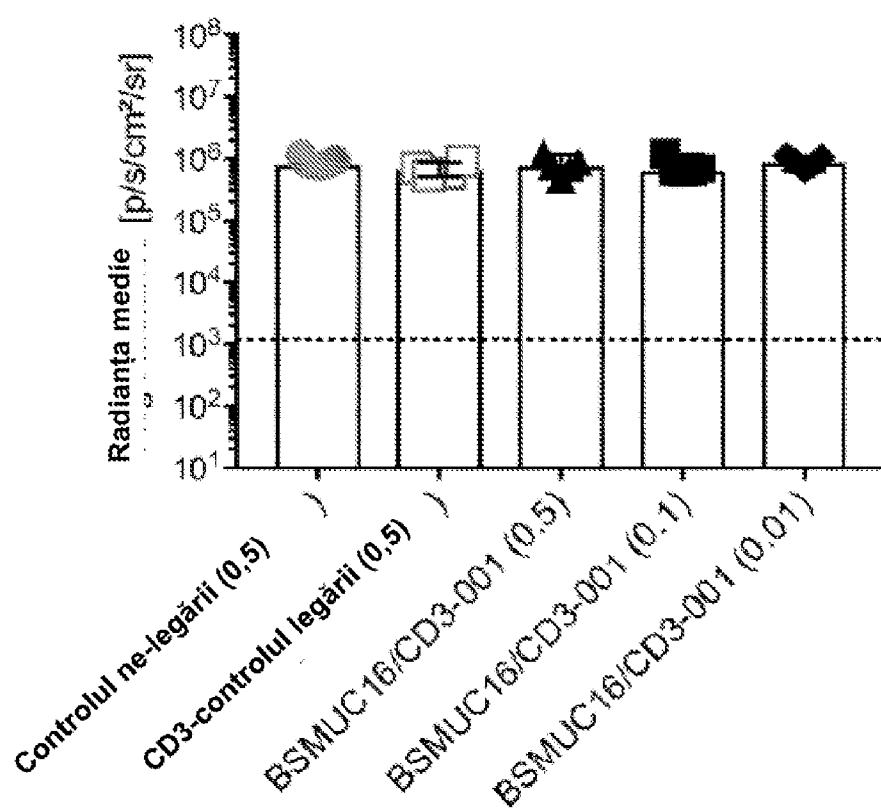


FIG. 4

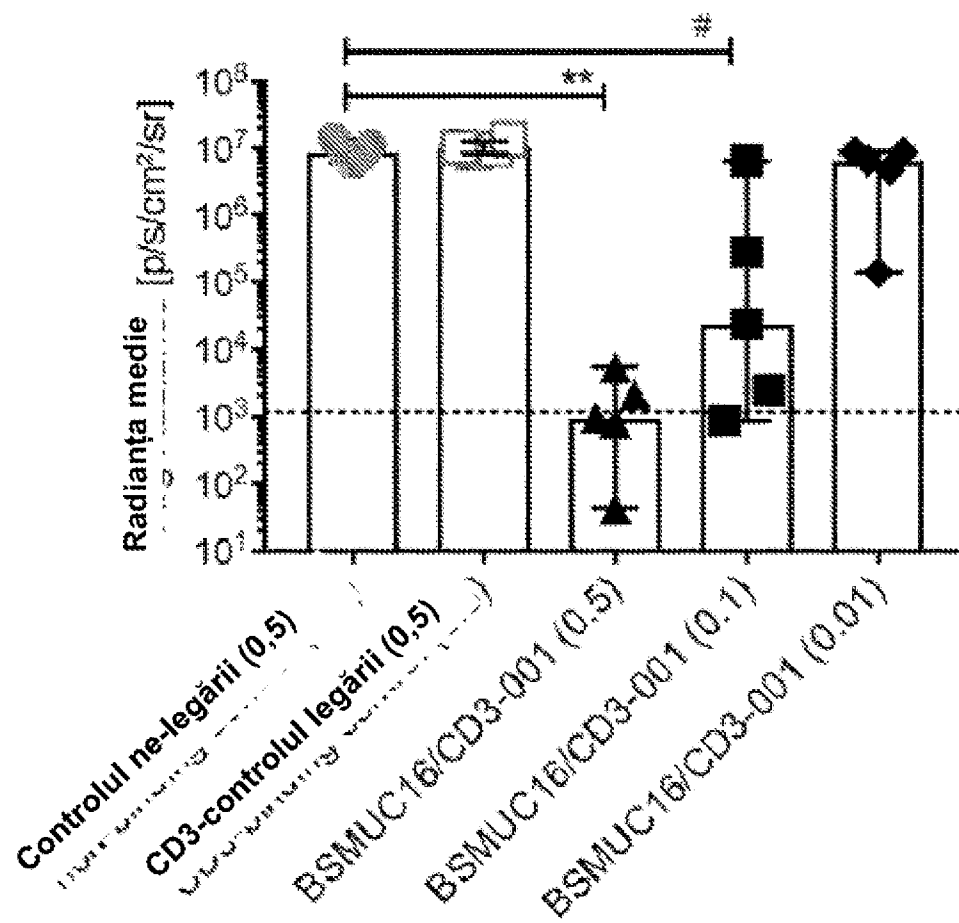


FIG. 5

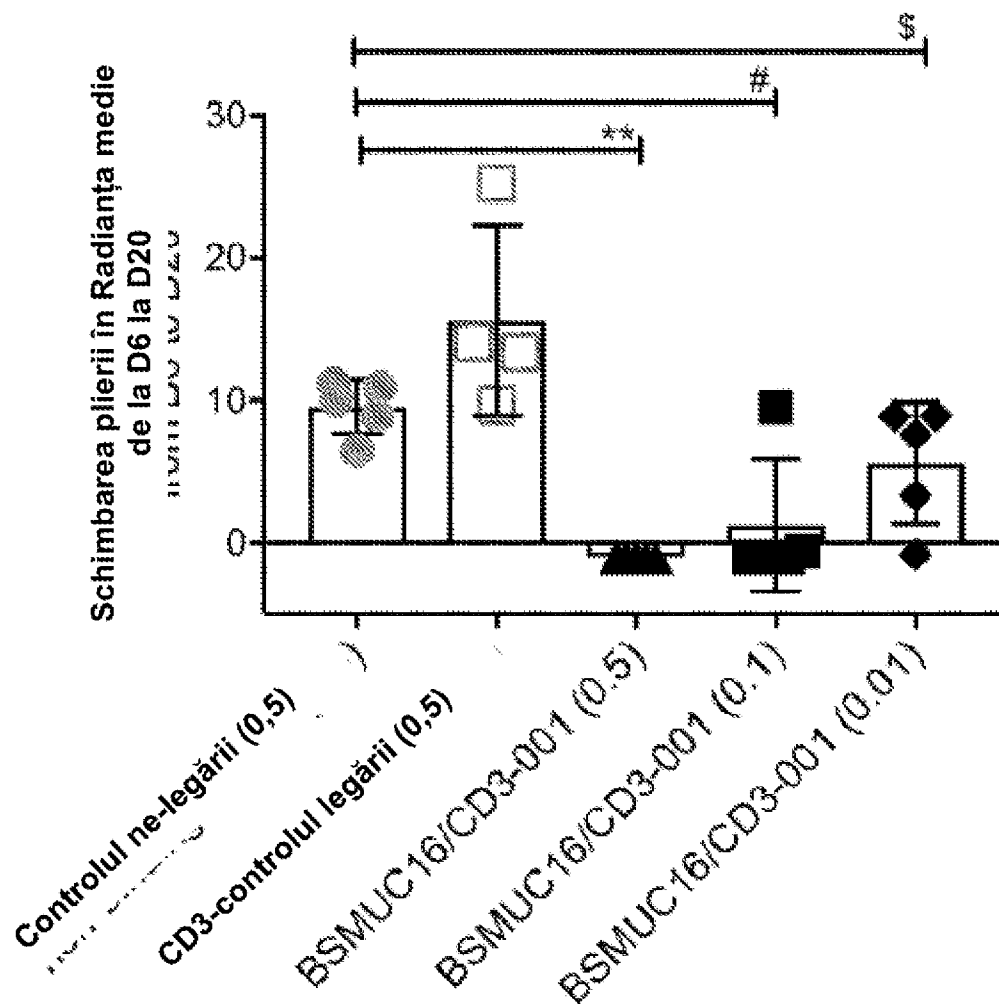


FIG. 6

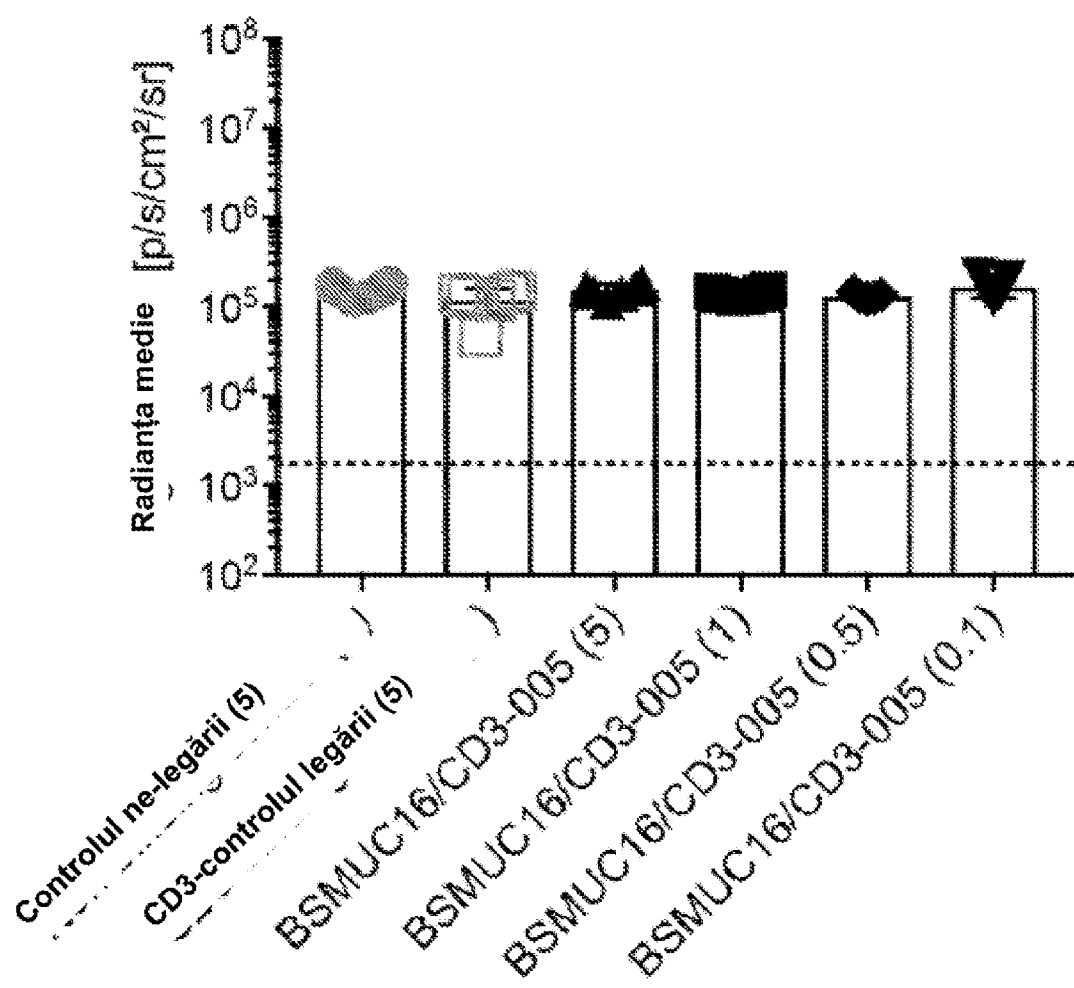


FIG. 7

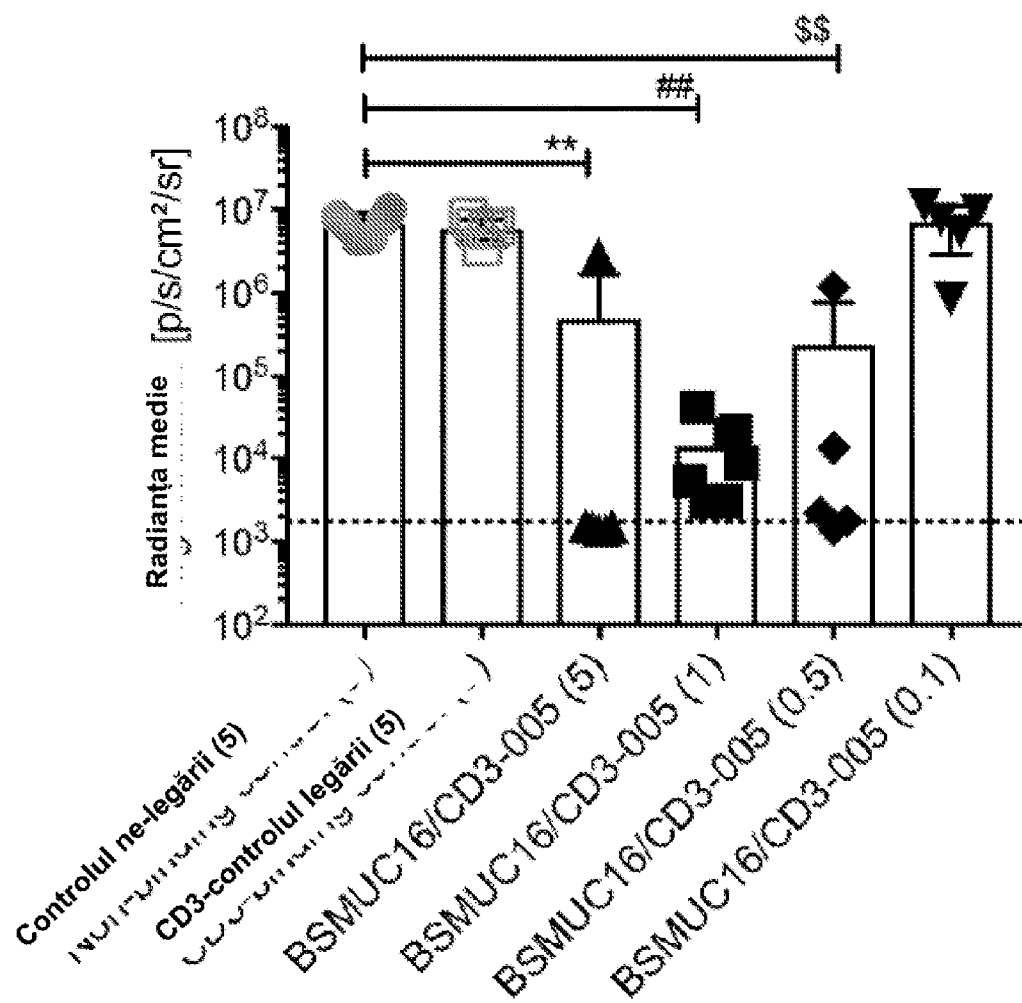


FIG. 8

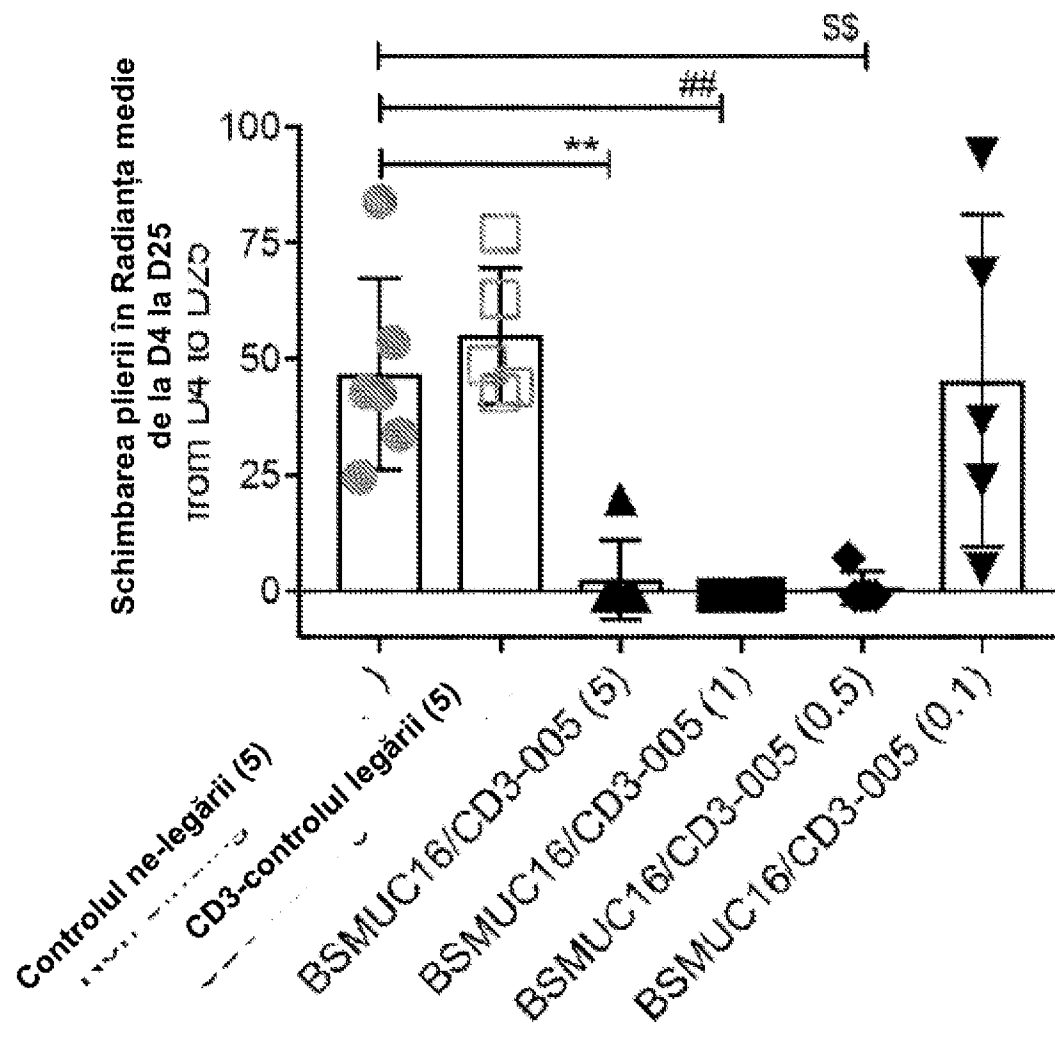


FIG. 9

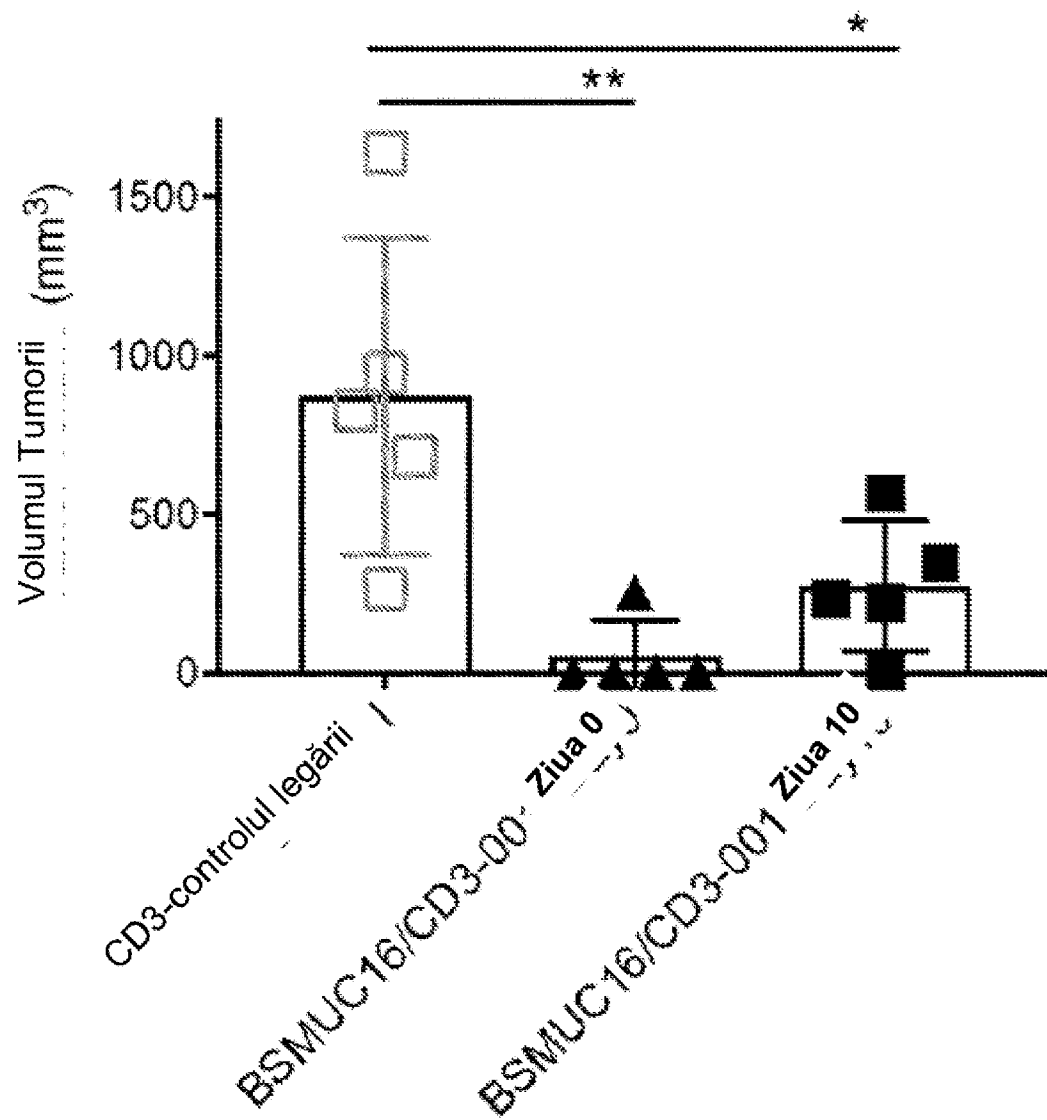


FIG. 10

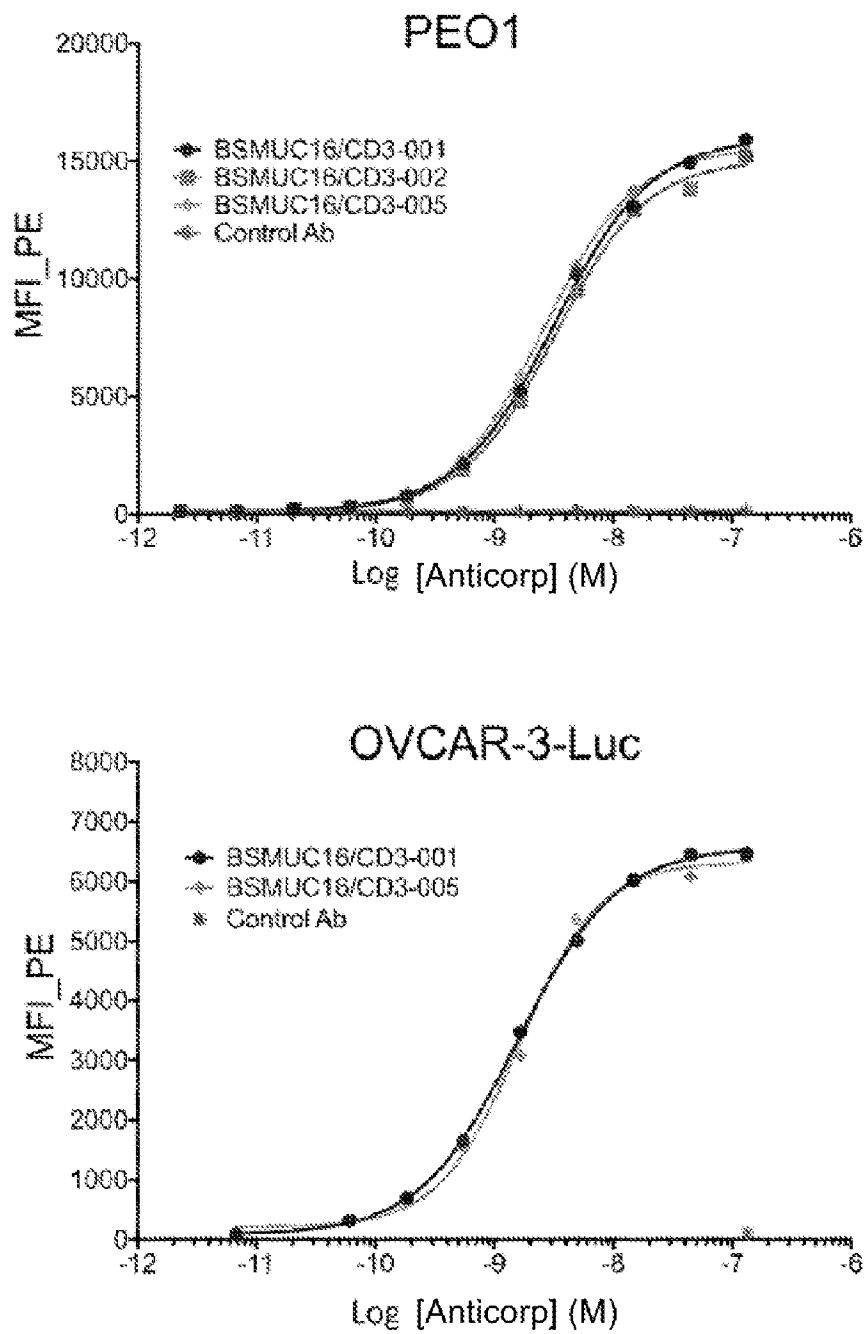


FIG. 11A

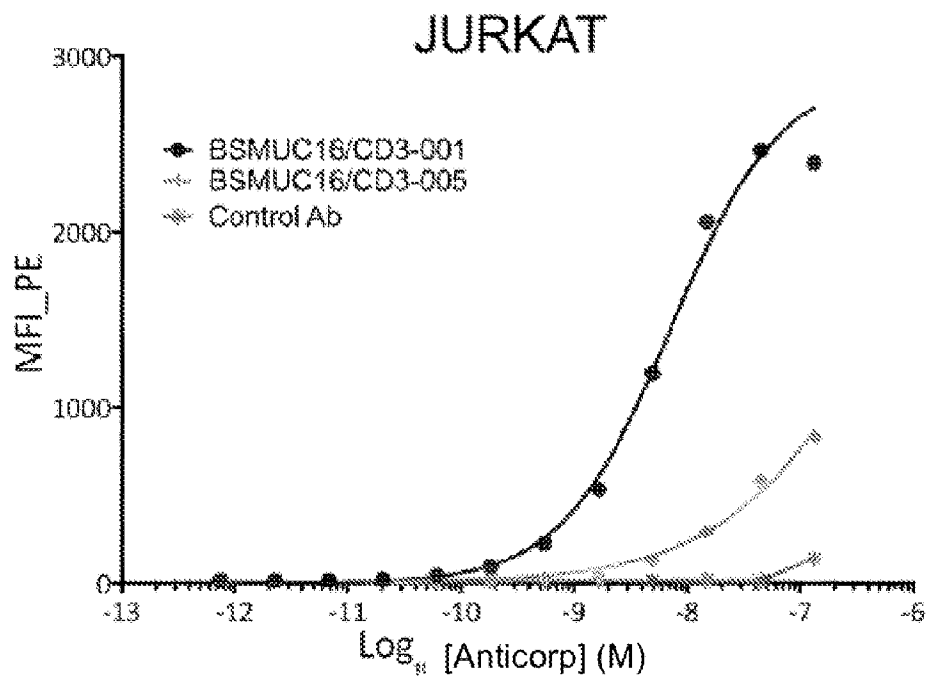
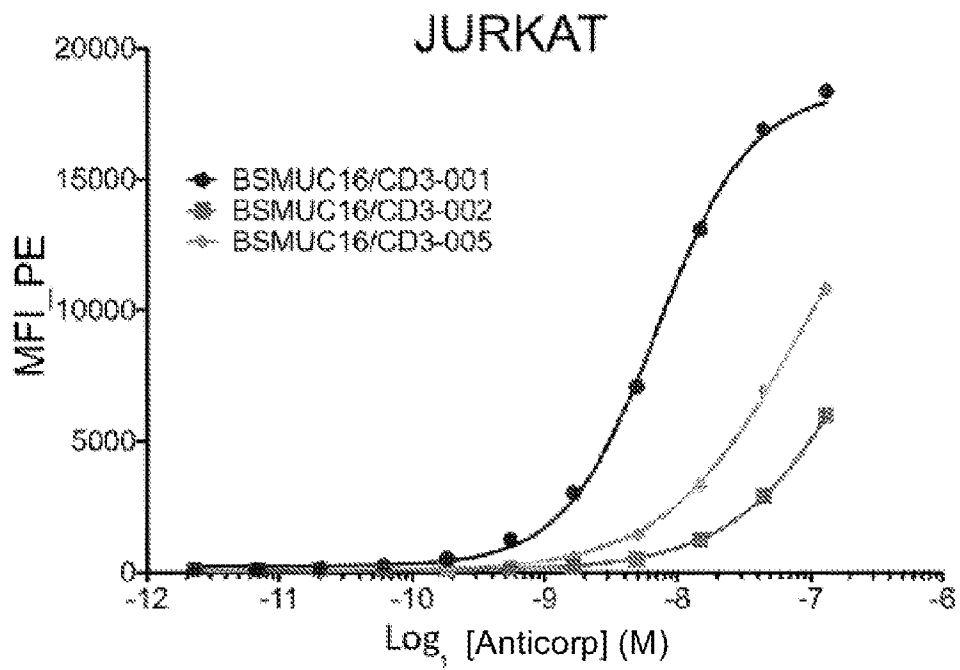


FIG. 11B

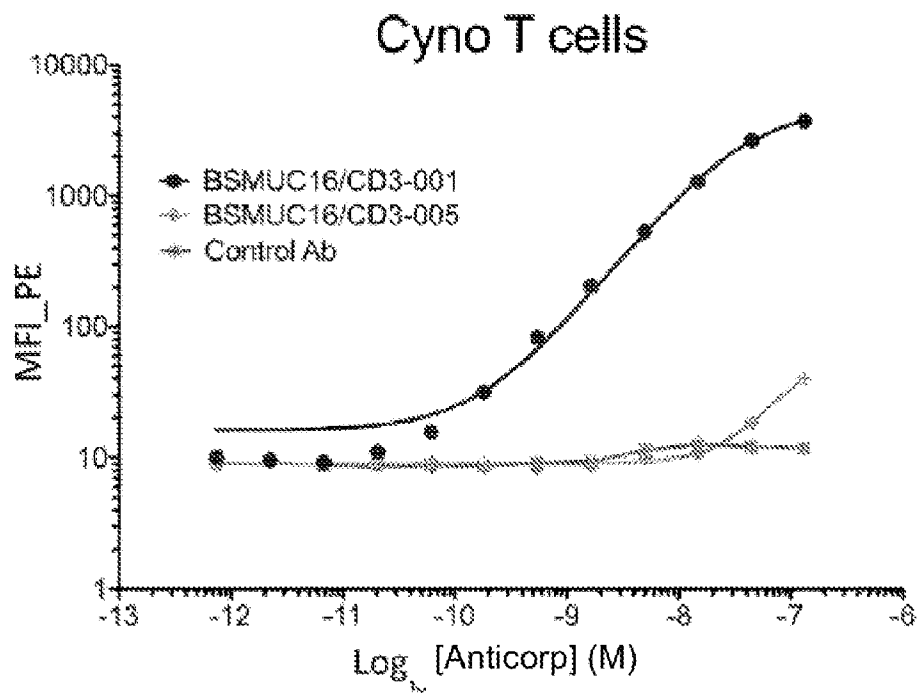
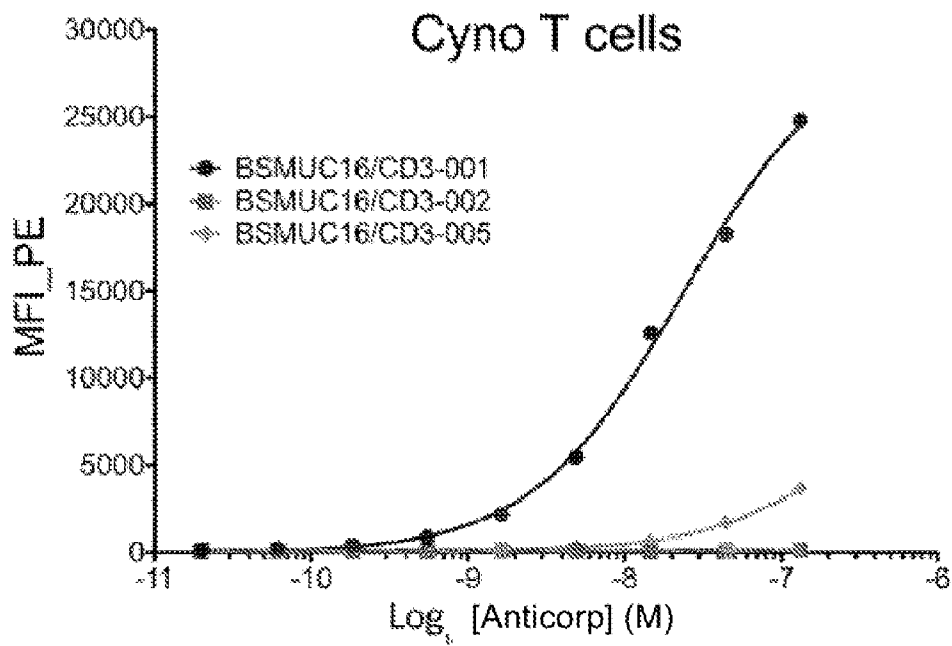


FIG. 11C

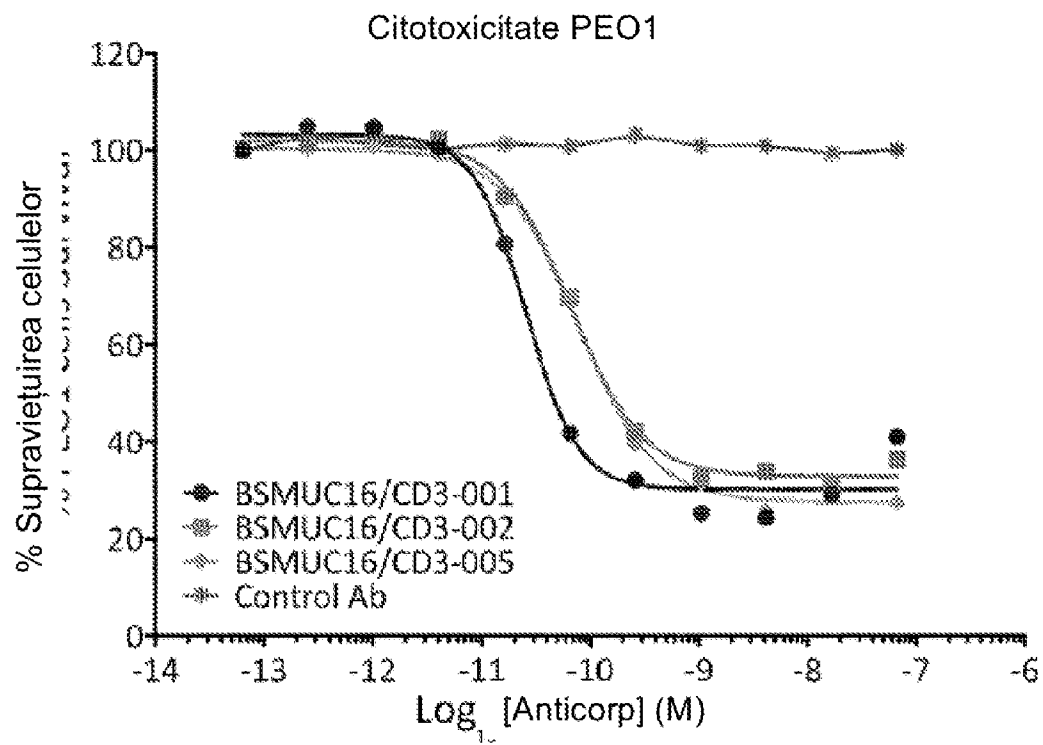


FIG. 12A

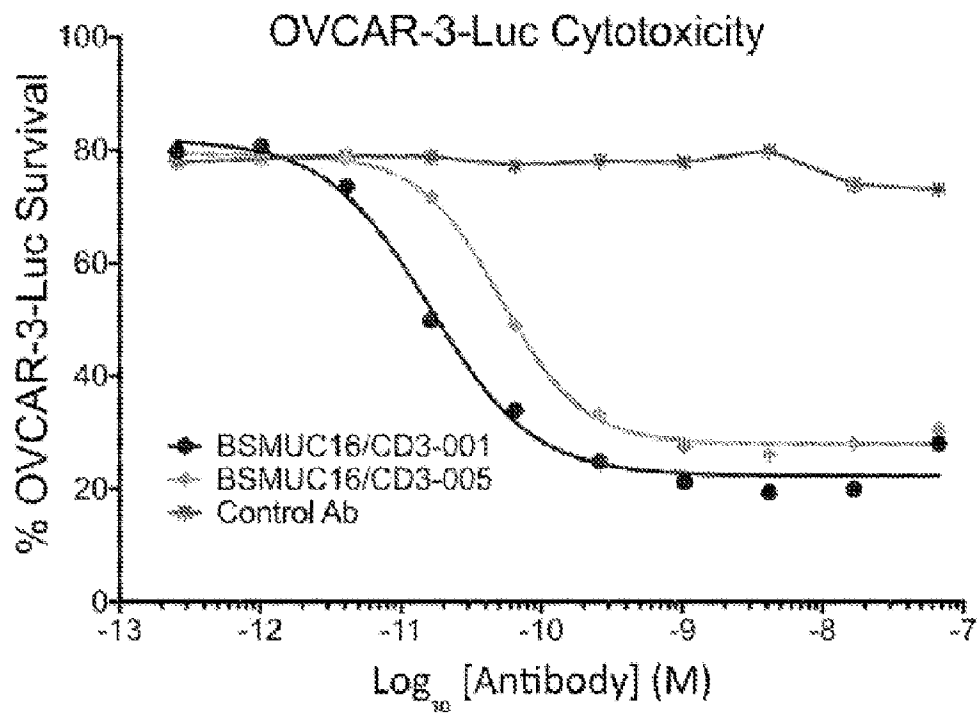


FIG. 12B