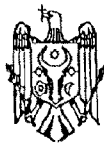




MD/EP 3328888 T2 2023.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3328888 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 16/30 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61K 39/395 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0558 (22) Data de depozit: 2016.07.29 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16748023.5, 2016.07.29 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3328888, 2018.06.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201562199823 P; 201562222590 P; 201662351823 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.07.31; 2015.09.23; 2016.06.17 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2023, 2023.04.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 49/2022, 2022.12.07 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2018, 2018.07.31
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventatori: KIRSHNER Jessica R., US; CRAWFORD Alison, US; THURSTON Gavin, US; SMITH Eric, US; HABER Lauric, US; DUDGEON Drew, US; RAFIQUE Ashique, US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Anticorpi anti-PSMA, molecule de legare a antigenelor bispecifice care leagă PSMA și CD3 și utilizările acestora

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la anticorpi care se leagă la antigenul specific prostatic (PSMA), la anticorpi bispecfici care se leagă la PSMA și CD3, și la metode de utilizare a acestora. Conform unor anumite variante de realizare, anticorpii prezentei invenții leagă PSMA uman cu afinitate mare și leagă CD3

2

inducând proliferarea celulelor T umane. Prezenta descriere include anticorpi care leagă PSMA și CD3 și induc uciderea mediată de celule T a celulelor tumorale, care exprimă PSMA. Conform unor anumite variante de realizare, prezenta invenție se referă la molecule bispecifice de legare a antigenului,

MD/EP 3328888 T2 2023.04.30

care cuprind un prim domeniu de legare a antigenului, care leagă în mod specific CD3 uman, și o a doua moleculă de legare a antigenului, care leagă în mod specific PSMA uman. În unele variante de realizare moleculele bispecifice de legare a antigenului din prezenta invenție sunt capabile să inhibe creșterea tumorilor de prostată, care exprimă PSMA. Anticorpii și moleculele bispecifice de legare la antigen, conform prezentei invenții, sunt utile pentru tratamentul bolilor și tulburărilor în care un răspuns imunitar țintit indus sau amplificat este dezirabil și/sau terapeutic benefic. De exemplu, anticorpii, conform prezentei invenții, sunt utili pentru tratamentul diferitor tipuri de cancer.

Revendicări: 10

Figuri: 4

(54) Anti-psma antibodies, bispecific antigen-binding molecules that bind psma and cd3, and uses thereof

(57) Abstract:

1

The present disclosure provides antibodies that bind to prostate-specific membrane antigen (PSMA), bispecific antibodies that bind to PSMA and CD3, and methods of using the same. According to certain embodiments, the antibodies of the disclosure bind human PSMA with high affinity and bind CD3 to induce human T cell proliferation. The disclosure includes antibodies that bind PSMA and CD3 and induce T cell-mediated killing of PSMA-expressing tumor cells. According to certain embodiments, the present disclosure provides bispecific antigen-binding molecules comprising a first antigen-binding domain that specifically binds human CD3, and a second antigen-binding molecule that specifically

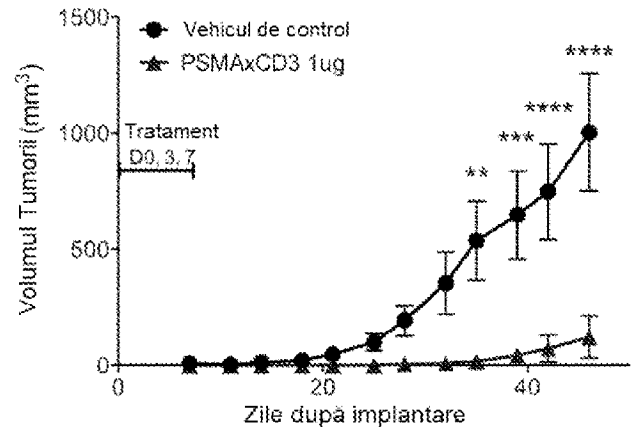
2

binds human PSMA. In certain embodiments, the bispecific antigen-binding molecules of the present disclosure are capable of inhibiting the growth of prostate tumors expressing PSMA. The antibodies and bispecific antigen-binding molecules of the disclosure are useful for the treatment of diseases and disorders in which an upregulated or induced targeted immune response is desired and/or therapeutically beneficial. For example, the antibodies of the disclosure are useful for the treatment of various cancers.

Claims: 10

Fig.: 4

FIG. 1



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

Prezenta invenție se referă la anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen, care sunt specifici pentru antigenul de membrană specific prostatei (PSMA) și metodele de utilizare ale acestora. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la molecule bispecifice de legare a antigenului care leagă PSMA și CD3 și metode de utilizare a acestora.

FUNDAL

Antigenul de membrană specific prostatei (PSMA), cunoscut și sub denumirea de folat hidrolaza 1 (FOLH1), este o glicoproteină integrală, nevărsată de membrană, care este foarte exprimată în celulele epiteliale de prostată și este un marker de suprafață celulară pentru cancerul de prostată. Expresia sa este menținută în cancerul de prostată rezistent la castrare, o afecțiune cu un rezultat slab și cu opțiuni limitate de tratament. Au fost investigate metode de tratare a cancerului de prostată prin țintirea PSMA. De exemplu, Yttrium-90 capromab este un radioterapeutic care cuprinde un anticorp monoclonal la un epitop intracelular al PSMA. Într-un alt exemplu, J591, un anticorp monoclonal la un epitop extracelular al PSMA, face parte din Lutetium-177 J591 radioterapeutic și în MLN2704, în care maitansinoidul 1 (DM1, un agent antimicrotubuli) este conjugat cu J591. Aceste terapii au fost asociate cu toxicitate. PSMA este, de asemenea, exprimată în neovasculatura altor tumori, cum ar fi carcinoamele vezicii urinare, renale, gastrice și colorectale.

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 gamma/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.

Moleculele de legare a antigenului care vizează PSMA, precum și moleculele bispecifice de legare a antigenului care leagă atât PSMA, cât și CD3 ar fi utile în setările terapeutice în care se dorește țintirea specifică și uciderea mediată de celulele T a celulelor care exprimă PSMA.

Lutterbuese și colab. Cancer Research 71(8): Supplement (Abstract 4561), 2011 se referă la caracterizarea preclinică a MT112/BAY 2010112, un anticorp PSMA CD3-bispecific pentru tratamentul cancerului de prostată. WO 2011/121110 și WO 2010/037836 se referă la molecule de anticorpi cu catenă unică bispecifică PSMAxCD3 specifice încrucișării speciilor. WO 2013/158856 se referă la anticorpi anti CD3 bispecfici care se leagă la antigenele asociate tumorii, cum ar fi PSMA. Baum și colab. Imunoterapia 5(1): 27-38, 2012 se referă la activitățile antitumorale ale diacorpilor PSMAxCD3 prin liza redirecționată a celulelor T a celulelor cancerului de prostată. Friedrich și colab. Cancer Research 72(8) Supplement (Abstract 3526), 2012 se referă la administrarea subcutanată a anticorpului BiTE bispecific PSMA/CD3 MT112/BAY 2010112 la șoareci cu prostată umană xenogrefe canceroase. Fortmüller și colab. The Prostate 71(6): 588-596, 2011 se referă la țintirea cancerului de prostată de către limfocite redirecționat de un diabody bispecific PSMAxCD3 cu un singur lanț. Bühler și colab. Imunologie cancerului, imunoterapie 57(1): 43-52, 2008 se referă la un diacorp bispecific îndreptat împotriva antigenului de membrană specific prostatei și CD3 pentru inducerea liza mediată a celulei T a celulelor canceroase de prostată.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Aici sunt descriși anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care se leagă la PSMA umană. Anticorpii pot fi utili, inter alia, pentru țintirea celulelor care exprimă PSMA. Prezenta invenție furnizează anticorpi bispecfici și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă PSMA uman și CD3 uman. Anticorpii bispecfici conform invenției cuprind un prim domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman și un al doilea domeniu de legare la antigen care

se leagă în mod specific PSMA uman, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 1514 sau SECV ID NR: 1618, și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 1386 și în care al doilea domeniu de legare a

antigenului care se leagă în mod specific PSMA umană cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 66 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde secvența amino acidă a SECV ID NR: 1386. Acești anticorpi 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 celulele T a celulelor care exprimă PSMA este benefică sau de dorit. De exemplu, anticorpii bispecifici pot direcționa activarea celulelor T mediată de CD3 către celule specifice care exprimă PSMA, cum ar fi celulele tumorale de prostată.

Exemple de anticorpi anti-PSMA din prezenta invenție sunt listate în Tabelele 1 și 2 de aici. Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu (HCVR) și regiunilor variabile ale lanțului ușor (LCVR), precum și regiunile care determină complementaritatea lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) și regiunile determinante ale complementarității lanțului ușor (LCDR1, LCDR2 și LCDR3) ale anticorpilor anti-PSMA exemplari. Tabelul 2 prezintă identificatorii de secvență ai moleculelor de acid nucleic care codifică HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ai anticorpilor anti-PSMA exemplificatori.

Aici sunt descriși anticorpi sau fragmente de legare la antigen ale acestora, cuprinzând un HCVR care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95 %, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Aici sunt descriși, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un LCVR care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR enumerate în Tabelul 1, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de aceasta.

Sunt descriși, de asemenea, anticorpi, sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR și LCVR (HCVR/LCVR) cuprinzând oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1, asociate cu oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR. enumerate în Tabelul 1. Aici sunt descriși anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR conținută în oricare dintre anticorpii anti-PSMA exemplificatori enumerați în Tabelul 1. Perechea de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR este selectată din grupul constând din SECV ID NR: 66/1 642 (de exemplu, H1 H1 1 81 0P2); și 1 22/1 30 (de exemplu, H1 H3465P).

Aici sunt descriși, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț greu CDR1 (HCDR1) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR1 enumerate în Tabelul 1 sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț greu CDR2 (HCDR2) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR2 enumerate în tabelul 1 sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț greu CDR3 (HCDR3) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR3 enumerate în Tabelul 1 sau o secvență de aminoacizi substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț ușor CDR1 (LCDR1) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR1 enumerate în Tabelul 1 sau o secvență de aminoacizi substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț ușor CDR2 (LCDR2) cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR2 enumerate în tabelul 1 sau o secvență de aminoacizi substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un lanț ușor CDR3 (LCDR3) cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR3 enumerate în tabelul 1 sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând o pereche de secvențe de aminoacizi HCDR3 și LCDR3 (HCDR3/LCDR3)

cuprinzând oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR3 enumerate în Tabelul 1 împerecheate cu oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR3 enumerate în Tabelul 1. Aici sunt descriși anticorpi, sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând o pereche de secvență de aminoacizi HCDR3/LCDR3 conținută în oricare dintre anticorpii anti-PSMA exemplificatori enumerați în Tabelul 1.

5 Perechea de secvență de aminoacizi HCDR3/LCDR3 este selectată din grupul constând din SECV ID NR: 72/1648 (de exemplu, H1 H1 1810P2) și 128/136 (de exemplu, H1 H3465P).

Aici sunt descriși, de asemenea, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un set de șase CDR-uri (adică HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) conținute în oricare dintre anticorpii anti-PSMA exemplificatori enumerați în Tabelul 1. Setul de secvențe de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 este selectat din grupul constând din SECV ID NR: 68-70-72-1644-1646-1648 (de exemplu, H1 H1 1810P2); și 124-126-128-132-134-136 (de exemplu, H1 H3465P).

Înrudit, prezenta dezvăluire furnizează anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând un set de șase CDR-uri (adică HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) conținute într-o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR ca definit de oricare dintre anticorpii anti-PSMA exemplificatori enumerați în Tabelul 1. De exemplu, sunt descriși aici anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând setul de secvențe de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 conținut într-o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din SECV ID NR: 66/146 (de exemplu, H1 H1 1810P2); și 122/130 (de exemplu, H1 H3465P). Metodele și tehnicile de identificare a CDR-urilor din secvențele de aminoacizi HCVR și LCVR sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi utilizate pentru a identifica CDR-urile din secvențele de aminoacizi HCVR și/sau LCVR specificate descrise aici. Convențiile exemplificatoare care pot fi utilizate pentru a identifica limitele CDR-urilor includ, de exemplu, definiția Kabat, definiția Chothia și definiția AbM. În termeni generali, definiția Kabat se bazează pe variabilitatea secvenței, definiția Chothia se bazează pe locația regiunilor buclei structurale, iar definiția AbM este un compromis între abordările Kabat și Chothia. Vezi, de exemplu, Kabat, „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); și Martin și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Bazele de date publice sunt, de asemenea, disponibile pentru identificarea secvențelor CDR într-un anticorp.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică anticorpi anti-PSMA sau porțiuni ale acestora. De exemplu, prezenta invenție furnizează molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1; în anumite cazuri molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCVR enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%. % identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCVR enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%. % identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR1 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCDR1 enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%. % identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR2 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCDR2 enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi HCDR3 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCDR3 enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR1 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCDR1 enumerate în

tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR2 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCDR2 enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi LCDR3 enumerate în Tabelul 1; molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCDR3 enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică un HCVR, în care HCVR cuprinde un set de trei CDR-uri (adică HCDR1-HCDR2-HCDR3), în care setul de secvențe de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3 este așa cum este definit de oricare dintre exemplele anticorpi anti-PSMA enumerați în Tabelul 1.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică un LCVR, în care LCVR cuprinde un set de trei CDR-uri (adică, LCDR1 -LCDR2-LCDR3), în care setul de secvențe de aminoacizi LCDR1 -LCDR2-LCDR3 este așa cum este definit de oricare dintre exemplele anticorpi anti-PSMA enumerați în Tabelul 1.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică atât un HCVR, cât și un LCVR, în care HCVR cuprinde o secvență de aminoacizi a oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1 și în care LCVR cuprinde o secvență de aminoacizi a oricăreia dintre secvențele de aminoacizi LCVR enumerate în Tabelul 1. Molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotide selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCVR enumerate în Tabelul 2 sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu aceasta și o secvență de polinucleotide selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCVR enumerate în Tabelul 2 sau o secvență substanțial similară secvența acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu aceasta. Molecula de acid nucleic codifică un HCVR și LCVR, în care HCVR și LCVR sunt ambele derivate din același anticorp anti-PSMA enumerat în Tabelul 1.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, vectori de expresie recombinanți capabili să exprime o polipeptidă cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp anti-PSMA. De exemplu, aici sunt descriși vectori de expresie recombinanți cuprinzând oricare dintre moleculele de acid nucleic menționate mai sus, adică moleculele de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele HCVR, LCVR și/sau CDR, așa cum este prezentat în Tabelul 1. De asemenea, sunt incluse celulele gazdă în care au fost introduși astfel de vectori, precum și metodele de producere a anticorpilor sau a porțiunilor acestora prin cultivarea celulelor gazdă în condiții care permit producerea de anticorpi sau fragmente de anticorpi și recuperarea anticorpilor. anticorpi și fragmente de anticorpi astfel produse.

Prezenta dezvoltare include anticorpi anti-PSMA având un model de glicozilare modificat. În unele exemple de realizare, modificarea pentru a elimina situsurile de glicozilare nedorite poate fi utilă sau un anticorp lipsit de o porțiune fucoză prezentă pe lanțul de oligozaharidă, 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 galactozilării pentru a modifica citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

Într-un alt aspect, este descrisă aici o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp uman recombinant sau un fragment al acestuia care leagă în mod specific PSMA și un purtător acceptabil farmaceutic. Într-un aspect înrudit, invenția prezintă o compoziție care este o combinație între un anticorp anti-PSMA și un al doilea agent terapeutic. Al doilea agent terapeutic este orice agent care este combinat în mod avantajos cu un anticorp anti-PSMA. Terapii combinate suplimentare și co-formulări care implică anticorpii anti-PSMA din prezenta invenție sunt dezvoltate în altă parte aici.

Într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează metode terapeutice pentru țintirea/uciderea celulelor tumorale care exprimă PSMA utilizând un anticorp anti-PSMA conform invenției, în care metodele terapeutice cuprind administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-PSMA conform invenției la un subiect care are nevoie de acesta. În unele cazuri, anticorpii anti-PSMA (sau fragmentele acestora de legare la antigen) pot fi utilizați pentru tratarea cancerului de prostată sau pot fi modificați pentru a fi mai citotoxici prin metode, inclusiv, dar fără a se limita la, domeniile Fc modificate pentru a crește ADCC (vezi de exemplu. Shield și colab. (2002) JBC 277:26733) radioimunoterapie (Akhtar, et al., 2012, Prostate-Specific Membrane Antigen-Based

Therapeutics; Adv Urol. 2012; 973820), conjugați anticorp-medicament (Olson, WC și Israel, RJ, 2014, Front Biosci (Landmark Ed). 19:12-33; DiPippo și colab. 15 februarie 2015, The Prostate, 75(3):303-313, publicat pentru prima dată pe linia 18 octombrie 2014) sau alte metode pentru creșterea eficienței ablației tumorii.

5 Aici este descrisă de asemenea, utilizarea unui anticorp anti-PSMA la fabricarea unui medicament pentru tratamentul unei boli sau tulburări legate de sau cauzate de celulele care exprimă PSMA.

Într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează anticorpi monospecfici anti-PSMA pentru aplicații de diagnostic, cum ar fi, de exemplu, reactivi de imagistică.

10 Într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează metode terapeutice pentru stimularea activării celulelor T folosind un anticorp anti-CD3 sau o porțiune de legare la antigen a unui anticorp conform invenției, în care metodele terapeutice cuprind administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp.

15 Într-un alt aspect, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care leagă antigenul de membrană specific de prostată uman (PSMA) cu o constantă de echilibru de disociere (KD) de legare mai mică de aproximativ 80 nM, măsurată într-o rezonanță plasmonică de suprafață. test la 37°C. Într-un alt aspect, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care leagă PSMA umană cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 10 minute, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață la 37°C.

20 Dezvoltarea furnizează în plus un anticorp sau un fragment de legare la antigen care concurează pentru legarea la PSMA uman cu un anticorp de referință care cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR așa cum este prezentat în Tabelul 1. Într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează un anticorp sau un fragment de legare a antigenului care concurează pentru legarea la PSMA umană cu un anticorp de referință care cuprinde o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; și 138/146.

25 Este descris aici de asemenea un anticorp sau un fragment de legare la antigen, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă la același epitop pe PSMA uman ca un anticorp de referință care cuprinde o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR așa cum este prezentat în Tabelul 1. Într-un alt aspect, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen se leagă la același epitop pe PSMA uman ca un anticorp de referință cuprinzând o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din SECV ID NR:2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; și 138/146.

30 Aici este descris de asemenea un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care leagă PSMA umană, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde: regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unei regiuni variabile de lanț greu (HCVR) având o secvență de aminoacizi, după cum este prezentat în Tabelul 1; și CDR-urile unei regiuni variabile de lanț ușor (LCVR) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în Tabelul 1. Într-un alt aspect, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen cuprinde CDR-urile de lanț greu și ușor ale unei perechi de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR selectate din grupul constând din: SECV ID NR:2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; și 138/146. Într-un alt aspect, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, selectate din grupul constând din: SECV ID NR: 4-6-8-1644-1646-1648; 12-14-16-1644-1646-1648; 20-22-24-1644-1646-1648; 28-30-32-1644-1646-1648; 36-38-40-1644-1646-1648; 44-46-48-1644-1646-1648; 52-54-56-1644-1646-1648; 60-62-64-1644-1646-1648; 68-70-72-1644-1646-1648; 76-78-80-1644-1646-1648; 84-86-88-1644-1646-1648; 92-94-96-1644-1646-1648; 100-102-104-1644-1646-1648; 108-110-112-1644-1646-1648; 116-118-120-1644-1646-1648; 124-126-128-132-134-136; și 140-142-144-148-150-152.

35 Într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care leagă PSMA umană, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde: (a) o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) având o secvență de aminoacizi selectată dintre grup constând din SECV ID NR: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122 și 138; și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 130 și 146. Într-un alt aspect, anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen conform revendicării 10, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din: SECV ID NR:2/1642; 10/1642; 18/1642;

26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 114/1642; 122/130; și 138/146.

Conform unui alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează molecule bispecifice de legare la antigen (de exemplu, anticorpi) care leagă PSMA și CD3. Astfel de molecule bispecifice de legare a antigenului sunt denumite aici, de asemenea, "molecule bispecifice anti-PSMA/anti-CD3", "molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA" sau "bsAbs PSMAxCD3". „Porțiunea anti-PSMA a moleculei bispecifice anti-PSMA/anti-CD3 este utilă pentru țintirea celulelor {de exemplu, celule tumorale} care exprimă PSMA (de exemplu, tumori de prostată), iar porțiunea anti-CD3 a moleculei bispecifice este utilă, pentru activarea celulelor T. Legarea simultană a PSMA 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-PSMA/anti-CD3 ale invenției sunt, prin urmare, utile, inter alia, pentru tratarea bolilor și tulburărilor legate de sau cauzate de tumorile care exprimă PSMA (de exemplu, cancerul de prostată).

Moleculele bispecifice de legare a antigenului conform acestui aspect al prezentei invenții 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 PSMA. Prezenta invenție include molecule bispecifice anti-PSMA/anti-CD3 [de exemplu, anticorpi bispecifici] 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 exemple de realizare ale invenției, domeniul de legare a antigenului anti-CD3 și domeniul de legare a antigenului anti-PSMA cuprind fiecare HCVR-uri diferite, distincte, asociate cu un LCVR comun. De exemplu, așa cum este ilustrat în Exemplul 4 de aici, anticorpii bispecifici 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 o pereche HCVR/LCVR derivată dintr-un anticorp anti-CD3; și un al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA, în care al doilea domeniu de legare a antigenului cuprinde un HCVR derivat dintr-un anticorp anti-PSMA asociat cu un LCVR derivat dintr-un anticorp anti-CD3 {de exemplu, același LCVR care este inclus în domeniul de legare a antigenului anti-CD3}. Cu alte cuvinte, în moleculele exemplificative dezvăluite aici, împerecherea unui HCVR de la un anticorp anti-PSMA cu un LCVR de la un anticorp anti-CD3 creează un domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA (dar nu leagă CD3). În astfel de exemple de realizare, primul și al doilea domeniu de legare la antigen cuprind HCVR anti-CD3 și anti-PSMA distincte, dar împărtășesc un LCVR anti-CD3 comun. În alte realizări, moleculele bispecifice de legare la antigen cuprind HCVR anti-CD3 și anti-PSMA distincte, dar au o LCVR comună. Secvența de aminoacizi a acestui LCVR este prezentată, de exemplu, în SECV ID NR:1642, iar secvențele de aminoacizi ale CDR-urilor corespunzătoare {adică LCDR1 - LCDR2-LCDR3} sunt prezentate în SECV ID NR:1644, 1646 și 1648, respectiv. Șoarecii modificate 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 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 exemple de realizare, 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 variante de realizare, 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.

Prezenta invenție furnizează molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR, oricare dintre aminoacizii HCVR/LCVR. perechi de secvențe, 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 prezentat în publicația SUA 2014/0088295.

În plus, prezenta invenție furnizează molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, așa cum este prezentat în Tabelele 12, 14 și 18 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 este prezentat în Tabelele 12, 15 și 20 de aici. Conform anumitor variante de realizare, 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 12, 14, 15, 18 și 20 de aici. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi CDR1-CDR2-CDR3 ale lanțului greu, așa cum este prezentat în Tabelele 12, 14 și 18 de aici,

și/sau oricare dintre secvențele de aminoacizi CDR1-CDR2-CDR3 ale lanțului ușor, așa cum sunt prezentate în Tabelele 12, 15 și 20 de aici.

Conform anumitor variante de realizare, prezenta invenție furnizează molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen 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 12, 14 și 18 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.

Aici sunt descrise, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen 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 12, 15 și 20 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.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care

primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde o pereche de secvențe de

aminoacizi HCVR și LCVR (HCVR/LCVR), așa cum este prezentat în Tabelele 12, 14, 15, 18 și 20 de

aici.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde un domeniu CDR3 cu lanț greu (HCDR3) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 12, 14 și 18 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 12, 15 și 20 de aici, sau o secvență substanțial similară a acestuia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau la identitate de secvență de cel puțin 99%.

În anumite cazuri, primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi HCDR3/LCDR3 așa cum este prezentat în Tabelele 12, 14, 15, 18 și 20 de aici.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA, în care primul domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific CD3 cuprinde un domeniu CDR1 cu lanț greu (HCDR1) având un aminoacid așa cum este prezentat în tabelele 12, 14, și 18 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 12, 14 și 18, 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 12, 14 și 18, 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 12, 15 și 20 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; un domeniu CDR2 al lanțului ușor (LCDR2) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 12, 15 și 20 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; și un domeniu CDR3 al lanțului ușor (LCDR3) având o secvență de aminoacizi așa cum este prezentată în tabelele 12, 15 și 20 de aici, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, la cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Anumite molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA, nelimitative, exemplificative ale invenției includ un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinzând domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, având secvențele de aminoacizi așa cum sunt prezentate în Tabelele 12, 14, 15, 18 și 20 de aici.

Prezenta dezvăluire furnizează în plus o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde regiuni care determină complementaritatea lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde un aminoacid. secvența așa cum este prezentată în Tabelul 12, Tabelul 14 sau Tabelul 18 și regiunile 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 12, Tabelul 15, sau Tabelul 20.

Într-un alt aspect, invenția furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului în care primul domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cuprinde regiuni care determină complementaritatea lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) selectată dintre grup constând din SECV ID NR: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506,

1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 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 selectată din grupul constând din SECV ID NR: 162, 930 și 1642.

5 Invenția furnizează în plus o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 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 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 grupul constând din SECV ID NR: 924, 156; 10 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620 și 1628; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622 și 1630; A1-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 15 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624 și 1632; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 932, 164 și 1644; A1 - LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 166, 934 și 1646; și A1-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, 936 și 1648.

Într-un alt aspect, invenția furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 20 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: SECV ID NR: 922/930, 154/162, 1482/1642, 1490/1642, 1498/1642, 1506/1642, 1514/1642, 1522/1642, 1530/1642, 1538/1642, 1546/1642, 1554/1642, 1562/1642, 1570/1642, 1578/1642, 1586/1642, 1594/1642, 1602/1642, 1610/1642, 1618/1642 și 1626/1642.

Într-un alt aspect, invenția furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 25 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 a antigenului care leagă în mod specific PSMA umană cuprinde trei regiuni de 30 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 SECV ID NR: : 924, 156, 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620, și 1628; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID 35 NR: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622, și 1630; A1-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624, și 1632; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 164, 932 și 1644; A1-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 166, 934 și 1646; și A1-LCDR3 cuprinde o 40 secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, 936 și 1648; și în care A2-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 124 și 68; A2-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 126 și 70; A2-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 128 și 72; 45 A2-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 932, 164 și 1644; A2-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 934, 166 și 1646; și A2-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 936, 168 și 1648.

Anumite molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA nelimitative, 50 exemplificative ale invenției includ un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 cuprinzând un lanț greu cuprinzând regiuni cadru de domeniu variabil având o secvență de aminoacizi selectată dintre FR1 (SECV ID NR: 1654), FR2 (SECV ID NR: 1656), FR3 (SECV ID NR: 1657) și FR4 (SECV ID NR: 1658).

De exemplu, moleculele exemplificative de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA ale invenției 55 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 SECV ID NR: 1659-1660-1661

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde o regiune variabilă a

lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR. :2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122 și 138, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, la cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care al
5 doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) având secvența de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 930, 162 și 1642, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care
10 al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR și LCVR (HCVR/LCVR) selectate din grupul constând din SECV ID NR: 122/930, 122/162 și 66/1642.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice anti-CD3/anti-PSMA, în care
15 al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde un domeniu CDR3 cu lanț greu (HCDR3) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 și 144 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 selectată din grupul constând din SECV ID NR: 936, 168 și 1648, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%,
20 cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

În anumite cazuri, al doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde o pereche de secvență de aminoacizi HCDR3/LCDR3 selectată din grupul constând din SECV ID NR: 128/936, 128/168 și 72/1648.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-
25 CD3/anti-PSMA, în care al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA cuprinde un domeniu CDR1 cu lanț greu (HCDR1) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ. ID NR: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 116, 124 și 140, sau o secvență substanțial similară a acestora 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 o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 102, 110, 118,
30 126 și 142, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență; un domeniu CDR3 cu lanț greu (HCDR3) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 și 144, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență; un domeniu CDR1 al lanțului ușor (LCDR1) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 932, 164 și 1644, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență; și un domeniu CDR2 al lanțului ușor (LCDR2) având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 934, 166 și 1646, sau o secvență
35 substanțial similară a acestora 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 selectată din grupul constând din SECV ID NR: 936, 168 și 1648, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

Anumite molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA, exemplificative,
45 nelimitative, ale invenției includ un al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA cuprinzând domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectiv, având secvențe de aminoacizi selectate din grupul constând din: SECV ID NR: 124-126-128-932-934-936, 124-126-128-164-166-168 și 68-70-72-1644-1646-1648.

Înrudit, invenția include molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA în care al
50 doilea domeniu de legare la antigen care leagă în mod specific PSMA cuprinde domeniile CDR ale lanțului greu și ușor conținute în regiunea variabilă a lanțului greu și ușor (HCVR/ LCVR) selectate din grupul constând din SECV ID NR: 122/930, 122/162 și 66/1642.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului care cuprinde un prim domeniu de legare a antigenului care leagă CD3 uman și un al doilea domeniu de legare
55 a antigenului care leagă PSMA umană, în care al doilea domeniu de legare a antigenului este derivat din anticorp sau antigen. -fragment de legare al oricăruia dintre anticorpii anti-PSMA dezvăluiți aici. Într-un alt aspect, invenția furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului care cuprinde 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 PSMA umană.

Molecula bispecifică de legare a antigenului poate lega celulele umane care exprimă CD3 uman și celulele de maimuță cynomolgus care exprimă CD3 cynomolgus. Într-un alt aspect, molecula bispecifică de legare a antigenului leagă celulele umane care exprimă PSMA umană și celulele de maimuță cynomolgus care exprimă PSMA cynomolgus.

Molecula bispecifică de legare a antigenului inhibă creșterea tumorii la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman. Invenția furnizează în plus o moleculă bispecifică de legare a antigenului care inhibă creșterea tumorii la șoarecii imunocompetenți care poartă xenogrefe de cancer de prostată uman. Invenția furnizează în plus o moleculă bispecifică de legare a antigenului care suprimă creșterea tumorală a tumorilor stabilite la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman. Invenția furnizează, în plus, o moleculă bispecifică de legare a antigenului care reduce creșterea tumorală a tumorilor stabilite în șoareci imunocompetenți purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman.

O moleculă bispecifică de legare a antigenului poate cuprinde i) un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific o celulă efectoră cu o valoare EC_{50} mai mare de aproximativ 40 nM și ii) un al doilea domeniu de legare a antigenului care specific leagă o celulă țintă a tumorii de prostată umană cu o valoare EC_{50} mai mică de 40 nM, în care o astfel de valoare a afinității de legare EC_{50} este măsurată într-un test de legare FACS in vitro.

De exemplu, molecula bispecifică de legare a antigenului poate include un prim domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 uman cu o valoare EC_{50} mai mare de aproximativ 40 nM, sau mai mare de aproximativ 100 nM, mai mare de aproximativ 200 nM sau mai mare de aproximativ 200 nM. 1 μ M. Într-o variantă de realizare, molecula bispecifică de legare a antigenului poate include un al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific celula țintă a tumorii de prostată cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 6 nM. În unele cazuri, 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 sau mai mare de aproximativ 1 μ M. În unele cazuri, primul domeniu de legare la antigen leagă în mod specific fiecare dintre CD3 uman și CD3 cynomolgus cu afinitate slabă sau deloc măsurabilă.

În unele exemple de realizare, molecula de legare a antigenului induce uciderea celulelor tumorale mediate de celule T cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 1,3 nM, măsurată într-un test in vitro de ucidere a celulelor tumorale mediate de celule T, de exemplu, în care celulele tumorale sunt celule C4-2, 22Rv1 și TRAMPC2_PSMA.

În unele aplicații, 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. În unele cazuri, primul domeniu de legare a antigenului 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 sau mai mare de aproximativ 120 nM. 300 nM, măsurat într-un test de legare a rezonanței plasmonilor de suprafață in vitro.

În anumite variante de realizare, 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 exemple de realizare, invenția furnizează o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care al doilea domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la PSMA umană cu o proteină de referință care leagă antigenul cuprinzând trei regiuni care determină complementaritatea 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 A2-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 124 și 68; A2-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 126 și 70; A2-HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 128 și 72; A2-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 164, 932 și 1644; A2-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 166, 934 și 1646; și A2-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, 936 și 1648. Dezvăluirea furnizează, de asemenea, o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care al doilea domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la PSMA 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 din grupul constând din SECV ID NR: 122 și 66 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 162, 930 și 1642.

Dezvăluirea furnizează de asemenea o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 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), în care A1-HCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 924, 156, 1484, 1492, 1500, 1508, 1516, 1524, 1532, 1540, 1548, 1556, 1564, 1572, 1580, 1588, 1596, 1604, 1612, 1620 și 1628; A1-HCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 926, 158, 1486, 1494, 1502, 1510, 1518, 1526, 1534, 1542, 1550, 1542, 1550, 1558, 1566, 1574, 1582, 1590, 1598, 1606, 1614, 1622 și 1630; A1 - HCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 928, 160, 1488, 1496, 1504, 1512, 1520, 1528, 1536, 1544, 1552, 1560, 1568, 1576, 1584, 1592, 1600, 1608, 1616, 1624 și 1632; A1-LCDR1 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 164, 932 și 1644; A1-LCDR2 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 166, 934 și 1646; și A1-LCDR3 cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, 936 și 1648. Dezvăluirea furnizează de asemenea o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 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 SECV ID NR: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506, 1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 și 1626 ,și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR:930, 162 și 1642.

Dezvăluirea furnizează de asemenea o moleculă bispecifică de legare a antigenului, în care 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 SECV ID NR: 922, 154, 1482, 1490, 1498, 1506, 1514, 1522, 1530, 1538, 1546, 1554, 1562, 1570, 1562, 1570, 1578, 1586, 1594, 1602, 1610, 1618 și 1626 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR:930, 162 și 1642; și în care al doilea domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la PSMA umană 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 din grupul constând din SECV ID NR:122 și 66 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 930, 162 și 1642.

Într-un aspect, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde o moleculă de legare a antigenului anti-PSMA sau o moleculă de legare a antigenului bispecific anti-PSMA/anti-CD3 și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic. Invenția furnizează în plus o metodă pentru tratarea unui cancer la un subiect. Metoda poate cuprinde administrarea subiectului a compoziției farmaceutice care cuprinde o moleculă de legare a antigenului anti-PSMA sau o moleculă de legare a antigenului bispecific anti-PSMA/anti-CD3 și un purtător acceptabil farmaceutic sau diluant. În unele exemple de realizare, cancerul este selectat din grupul constând din cancer de prostată, cancer de rinichi, cancer de vezică urinară, cancer colorectal și cancer gastric. În unele cazuri, cancerul este cancer de prostată. În unele cazuri, cancerul de prostată este cancer de prostată rezistent la castrare.

Prezenta dezvăluire furnizează molecule de acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele HCVR, LCVR sau CDR ale moleculelor bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA descrise aici, incluzând molecule de acid nucleic care cuprind secvențele de polinucleotide așa cum este prezentat. în tabelele 2, 13, 15, 17, 19 și 21 de aici, precum și molecule de acid nucleic cuprinzând două sau mai multe dintre secvențele de polinucleotide, așa cum sunt prezentate în tabelele 2, 13, 15, 17, 19 și 21 în orice combinație sau aranjare funcțională a acestora. Vectorii de expresie recombinanți care poartă 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.

Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA în care oricare dintre domeniile de legare la antigen menționate mai sus care leagă în mod specific CD3 sunt combinate, conectate sau asociate în alt mod cu oricare dintre domeniile de legare la antigen menționate mai sus care leagă în mod specific PSMA pentru a forma o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă CD3 și PSMA.

Aici sunt descrise molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA având un model de glicozilare modificat. În unele aplicații, modificarea pentru a elimina situsurile de glicozilare nedorite poate fi utilă sau un anticorp lipsit de o porțiune fucoză prezintă pe lanțul de oligozaharidă, 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 galactozilării pentru a modifica citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

Dezvăluirea furnizează de asemenea o compoziție farmaceutică care cuprinde o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA așa cum este dezvăluită aici și un purtător acceptabil farmaceutic. Dezvăluirea prezintă o compoziție care este o combinație între o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA și un al doilea agent terapeutic. Al doilea agent terapeutic este orice agent care este combinat în mod avantajos cu o moleculă bispecifică de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA. Exemple de agenți care pot fi combinați în mod avantajos cu o moleculă bispecifică de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA sunt discutați în detaliu în altă parte aici.

Dezvăluirea furnizează de asemenea metode terapeutice pentru ținerea/uciderea celulelor tumorale care exprimă PSMA folosind o moleculă de legare antigenă bispecifică anti-CD3/anti-PSMA 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-PSMA conform invenției la un subiect care are nevoie de aceasta.

Aici este descrisă, de asemenea, utilizarea unei molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA la fabricarea unui medicament pentru tratamentul unei boli sau tulburări legate de sau cauzate de celulele care exprimă PSMA.

Alte exemple de realizare vor deveni evidente dintr-o revizuire a descrierii detaliate care urmează. Invenția este definită în revendicările 1 și 7. Alte aspecte și forme de realizare preferate sunt definite în revendicările dependente. Orice aspecte, exemplele de realizare și exemplele prezentei dezvăluiri care nu intră în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate nu fac parte din invenție și sunt furnizate doar în scopuri ilustrative.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Fig. 1 ilustrează faptul că anticorpul bispecific PSMAxCD3 inhibă creșterea unei linii celulare de prostată umană in vivo. Șoarecii NSG au fost co-implantați cu celule 22Rv1 și PBMC umane subcutanat. Animalele au fost dozate de trei ori în total în Zilele 0, 3 și 7 cu 1 ug de PSMAxCD3 bispecific i.p. Datele sunt exprimate ca medie (SEM) și au fost analizate utilizând analiza varianței (ANOVA).

Figurile. 2A-2D arată că tratamentul cu un anticorp bispecific PSMAxCD3 induce o creștere tranzitorie dependentă de doză a citokinelor circulante, unde nivelurile de citokine (interferon-gamma, IFN-g; factor de necroză tumorală, TNF; interleukină-2, IL-2; și interleukina-6, IL-6) sunt testate la 4 ore după tratament.

Figurile. 3A-3B ilustrează faptul că tratamentul cu anticorp bispecific PSMAxCD3 la un șoarece cu celule T umanizate (100 μg/șoarece) induce creșterea acută a citokinelor (de ex. IFNγ) (Fig. 3A), precum și scăderea tranzitorie a celulelor T circulante (Fig. 3B).

Figurile. 4A-4C ilustrează efectul anticorpilor bispecfici PSMAxCD3 asupra celulelor T efectoare din splina șoarecilor imunocompetenți.

DESCRIERE DETALIATA

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 exemple de realizare 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 SECV ID NR:1649; CD3-delta umană cuprinde secvența de aminoacizi așa cum este prezentată în SECV ID NR:1650. 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 gamma/epsilon, delta/epsilon și zeta/zeta CD3}. Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale prezentei invenții 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 la 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 "PSMA", așa cum este utilizată aici, se referă la antigenul de membrană specific prostatei, cunoscut și ca folat hidrolaza 1 (FOLH1). PSMA este o glicoproteină integrală, fără membrană, care este foarte exprimată în celulele epiteliale de prostată și este un marker de suprafață celulară pentru cancerul de prostată. Secvența de aminoacizi a PSMA umană este prezentată în SECV ID NR:1651.

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

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, PSMA 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 determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H and 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 realizări ale invenției, FR-urile anticorpului anti-PSMA sau anticorpului anti-CD3 (sau porțiunea de legare a antigenului a acestuia) 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 a antigenului” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la un antigen 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 de domeniu unic, anticorpi deleți de domeniu, anticorpi himeric, anticorpi grefați cu CDR, diacorpi, triacorpi, tetrabopi, minicorpi, nanocorpi (de ex. nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți, etc.), imunofarmaceutice modulare mici (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 având 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 variante de realizare, 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 ale domeniilor 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, 1, 5, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între domenii variabile și/sau constante adiacente într-un singur moleculă polipeptidică. Mai mult, un fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții poate cuprinde un homodimer sau heterodimer (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 anticorpi complete, fragmentele de legare la antigen pot fi monospecific sau multispecific (de exemplu, bispecific). 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 dezbătute aici, poate fi adaptat pentru utilizare în contextul unui fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții utilizând tehnici de rutină disponibile în domeniu.

Anticorpii prezentei invenții 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 conform invenției 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 anticorpii legați 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 U.S. 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 anticorpii să medieze citotoxicitatea.

Anticorpii monospecifici anti-PSMA sau anticorpii bispecifici anti-PSMA/anti-CD3 ai invenției 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 conform invenției 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 conform invenției pot fi, în unele exemple de realizare, 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 exemple de realizare, 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*.

Anticorpii umani 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-lanț 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 fără a se limita 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 C_H2 sau C_H3 care pot fi de dorit, de exemplu, în producție, pentru a îmbunătăți randamentul formei de anticorpi dorite.

Anticorpii conform invenției 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 invenții. Un anticorp izolat include, de asemenea, un anticorp in situ într-o celulă recombinată. Anticorpii izolați sunt anticorpi care au fost supuși la cel puțin o etapă de purificare sau izolare. Conform anumitor variante de realizare, un anticorp izolat poate fi în mod substanțial lipsit de alte materiale celulare și/sau substanțe chimice.

De asemenea sunt descriși aici anticorpi cu un singur braț care leagă PSMA. 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. Anticorpii cu un singur braț pot cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR așa cum sunt prezentate în Tabelul 1.

Anticorpii anti-PSMA sau anti-PSMA/anti-CD3 dezvăluiți 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 anticorpii. 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. Prezenta invenție include 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 (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 variante de realizare, 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 anticorpusul. În alte exemple de realizare, 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 anticorpusul a fost derivat inițial). Mai mult, anticorpii 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, anticorpii 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, afinitatea de legare crescută, proprietățile biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz). fi), imunogenitate redusă etc.

Prezența dezvoltării include, de asemenea, anticorpi anti-PSMA sau anti-PSMA/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, prezența invenții include anticorpi anti-PSMA sau anti-PSMA/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 12, 14, 15, 18 și 20 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 la cel puțin aproximativ 96%, 97%, 98% sau 99% din bazele nucleotidice, măsurate prin orice algoritm binecunoscut de identitate de secvență, cum ar fi FASTA, BLAST sau Gap, așa cum s-a 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 resturilor 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 de aminoacizi conservatoare preferate sunt: valină-

leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamină. 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 non-negativă 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 utilizând FASTA care utilizează 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 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 implicați. Vezi, de exemplu, Altschul și colab. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Mutații ale liniei germinale

Anticorpul anti-CD3 dezvoltat 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 în prezenta anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen, 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 corespunzător al secvenței de linie germinale din care a derivat anticorpul sau la restul (reziduurile) corespunzătoare din altă secvență de linie germinale umană sau la o substituție conservativă a aminoacizilor a restului (reziduurilor) corespunzătoare din linia germinale (astfel de modificări de secvență sunt numite aici colectiv ca „mutații ale liniei germinale”) și care au legare slabă sau deloc detectabilă la un antigen CD3. Mai mulți astfel de anticorpi exemplificativi care recunosc CD3 sunt descriși în Tabelele 12 și 18 de aici.

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 germinale, 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 germinale diferite. Odată obținuți, anticorpul și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testați pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitate de legare îmbunătățită, afinitate de legare slabă sau redusă, proprietăți farmacocinetice îmbunătățite sau intensificate, imunogenitate redusă etc.

Sunt descriși în prezenta anticorpi 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, prezenta invenție include 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 12, 14, 15, 18 și 20 de aici. Anticorpul și moleculele bispecifice de legare a antigenului din prezenta invenție cuprind 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 domeniile individuale de legare la antigen au fost derivate, menținând sau îmbunătățind în același timp legarea dorită, slabă până la 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 aminoacidului menține sau îmbunătățește 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) catene 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 și colab. (1992) Science 256:1443-1445. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare non-negativă în matricea log-probabilității PAM250.

Prezenta invenție include, de asemenea, 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 dezvăluite 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 între ele prin substituții conservatoare, identitatea secvenței procentuale sau gradul de similitudine pot fi ajustate 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 de asemenea 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 impliciti 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 utilizând FASTA care utilizează parametrii impliciti 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 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 și colab. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Nucleic Acids 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 afinitatea de legare scăzută utilizând una sau mai multe teste *in vitro*. Deși anticorpilor care recunosc un anumit antigen sunt de obicei analizați pentru scopul lor prin testarea afinității de legare ridicată (adică puternică) la antigen, anticorpilor prezentei invenții prezintă legare slabă sau legare care nu poate fi detectată. 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 prin metodele descrise aici.

Proprietățile de Legare ale Anticorpilor

Așa cum este utilizat aici, termenul "legare" în contextul legării unui anticorp, al unei imunoglobuline, al unui fragment de legare a anticorpului sau a unei proteine care conține Fc la oricare, de exemplu, un antigen predeterminat, cum ar fi o proteină de suprafață 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, prin tehnologia rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) într-un BIACore 3000 care utilizează antigenul ca ligand și anticorp, 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 prin sortare a celulelor activate fluorescent (FACS), sunt de asemenea utilizate în mod obișnuit, iar datele FACS se corelează bine cu alte metode, cum ar fi legarea prin competiție a

radioligandului și SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods, 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, și colab. J Immunol Methods, 2005, 302(1-2):68-77).

În consecință, anticorpul sau proteina de legare a antigenului din invenție 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). Conform prezentei invenții, 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 o legare nedetectabilă, totuși un astfel de anticorp poate fi asociat cu un al doilea braț de legare a antigenului pentru producerea unui anticorp bispecific conform invenției.

Termenul " K_D " (M) se referă la constanta de echilibru de disociere a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen sau la 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 mai mare, adică mai puternică, este 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 unele circumstanțe, o afinitate de legare mai mare (sau K_D) a unei anumite molecule {de ex. anticorp} la molecula sa parteneră interactivă (de ex. antigenul X) în comparație cu afinitatea de legare a moleculei (de ex. anticorp) la o altă moleculă parteneră interactivă (de ex. antigenul Y) poate fi exprimată 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 a anticorpului. Constanta de echilibru de asociere se obține prin împărțirea k_a la 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 maxim după un timp de expunere specificat. EC₅₀ reprezintă în esență concentrația unui anticorp în care se observă 50% din efectul său maxim. În anumite exemple de realizare, 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, legarea scăzută poate fi definită ca o concentrație crescută de anticorp 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

Anticorpul pot fi monospecfici, bispecfici sau multispecfici. Anticorpul 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 și colab., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Anticorpul monospecfici anti-PSMA sau anticorpul bispecfici anti-PSMA/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 fragment al acestuia 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 pentru a produce un anticorp bispecific sau multispecific cu o a doua specificitate de legare sau una suplimentară.

Utilizarea expresiei "anticorp anti-CD3" sau "anticorp anti-PSMA" aici este destinată să includă atât anticorpi monospecfici anti-CD3 sau anti-PSMA, cât și anticorpi bispecfici cuprinzând un braț de

legare a CD3 și un braț de legare a PSMA. Astfel, prezenta invenție include anticorpi bispecfici în care un braț al unei imunoglobuline leagă CD3 uman, iar celălalt braț al imunoglobulinei este specific pentru PSMA umană. Brațul de legare CD3 poate cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR, așa cum este prezentat în Tabelele 12, 14, 15, 18 și 20 de aici.

În anumite variante de realizare, brațul care leagă CD3 se leagă de CD3 uman și induce activarea celulelor T umane. În anumite variante de realizare, brațul care leagă CD3 se leagă slab de CD3 uman și induce activarea celulelor T umane. În alte realizări, 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 realizări, 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 PSMA poate cuprinde oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR/LCVR sau CDR așa cum este prezentat în Tabelul 1 de aici.

Conform anumitor exemple de realizare, prezenta invenție include molecule bispecifice de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 și PSMA. Astfel de molecule pot fi denumite aici, de exemplu, "anti-CD3/anti-PSMA" sau "anti-CD3xPSMA" sau "CD3xPSMA" molecule bispecifice, sau altă terminologie similară (de exemplu, anti-PSMA/anti-CD3).

Termenul "PSMA", așa cum este utilizat aici, se referă la proteina PSMA umană, cu excepția cazului în care este specificat ca fiind dintr-o specie non-umană (de exemplu, "PSMA de șoarece", "PSMA de maimuță" etc.). Proteina PSMA umană are secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NR:1651.

Moleculele bispecifice de legare la antigen menționate mai sus care leagă în mod specific CD3 și PSMA 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 de test de legare *in vitro*.

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 de determinare a complementarității (CDR) care singură, sau în combinație cu unul sau mai multe CDR-uri și/sau regiuni cadru (FR-uri) suplimentare, 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, PSMA).

În anumite exemple de realizare ale prezentei invenții, molecula bispecifică de legare a antigenului este un anticorp bispecific. 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 din prezenta invenție. 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 la antigen, formând astfel o moleculă bispecifică de legare a antigenului. Așa 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 de aceeași structură sau constituție sau similară. De exemplu, un domeniu de multimerizare poate fi o polipeptidă care cuprinde un domeniu de imunoglobulină C_H3 . Un exemplu nelimitator 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 din prezenta invenție vor cuprinde în mod tipic două domenii de multimerizare, de exemplu, două domenii Fc care sunt fiecare parte individual 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 variante de realizare, 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 variante de realizare, 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 a antigenului din prezenta invenție. 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 în contextul prezentei invenții 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 bispecifice Mab² (a se vedea, de exemplu, Klein și colab. 2012, mAbs 4:6, 1-11, și referințele citate aici, pentru o revizuire a formatelor de mai sus).

În contextul moleculelor bispecifice de legare a antigenului din prezenta invenție, 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 versiunea care apare în mod natural, de tip sălbatic, a domeniului Fc. De exemplu, invenția include 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. Într-o variantă de realizare, 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 ex., 308F, V308F) și 434. Într-o variantă de realizare, modificarea cuprinde o modificare 428L {de ex., 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).

Prezenta invenție include, de asemenea, 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. Într-un exemplu de realizare, primul domeniu Ig C_H3 leagă proteina A și 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). Vezi, de exemplu, brevetul US nr. 8.586.713. Alte modificări care pot fi găsite în al doilea C_H3 includ: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M și V82I (de către IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M și V422I de către UE) în cazul anticorpilor IgG1; 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 realizări, 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 C_H3 derivată dintr-o IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. Un domeniu Fc himeric poate conține, de asemenea, o regiune balama himerică. 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 Fc himeric 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 din prezenta invenție sunt descrise în Publicația SUA 2014/0243504, publicată la 28 august 2014, care este încorporată aici în întregime. 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 exemple de realizare, 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% identică cu oricare dintre SECV ID NR: 1663, SECV ID NR: 1664, SECV ID NR: 1665, SECV ID NR: 1666, SECV ID NR: 1667, SECV ID NR: 1668, SECV ID NR: 1669, SECV ID NR: 1670 SECV ID NR: 1671 sau SECV ID NR: 1672. În unele realizări, regiunea constantă a lanțului greu (CH) cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1663, SECV ID NR: 1664, SECV ID NR: 1665, SECV ID NR: 1666, SECV ID NR: 1666 NR: 1667, SEQ ID NR: 1668, SECV ID NR: 1669, SECV ID NR: 1670, SECV ID NR: 1671 și SECV ID NR: 1672.

În alte exemple de realizare, moleculele de legare a antigenului cuprind 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 NR: 1673, SECV ID NR: 1674, SECV ID NR: 1675, SECV ID NR: 1676, SECV ID NR: 1677, SECV ID NR: 1678, SECV ID NR: 1679, SECV ID NR: 1680, SECV ID NR: 1681 sau SECV ID NR: 1682. În unele realizări, domeniul Fc cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1673, SECV ID NR: 1674, SECV ID NR: 1675, SECV ID NR: 1676, SECV ID NR: 1677, SECV ID NR: 1678, SECV ID NR: 1679, SECV ID NR: 1680, SECV ID NR: 1681 și SECV ID NR: 1682.

Variante de Secvență

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 din prezenta invenție 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 reziduul(le) corespunzătoare al secvenței de linie germinală din care a derivat anticorpusul 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 germinală (astfel de modificări de secvență sunt 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 variante de realizare, 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 exemple de realizare, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutate găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutate găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte exemple de realizare, 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 domeniul antigenului 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 alte secvențe germinale. 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

5 îmbunătățită, afinitatea de legare crescută, proprietățile biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz), imunogenitate redusă etc.

Sunt descrise în prezenta, de asemenea, 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

10 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 sunt 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

15 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:

20 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 dezvoltată în Gonnet și colab. (1992) Science 256:1443-1445. O înlocuire

25 „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

Prezenta invenție include, de asemenea, 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

30 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

35 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

40 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

45 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 utilizând FASTA care utilizează 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

50 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 implicați. Vezi, de exemplu, Altschul și colab. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Legare Dependentă de pH

Sunt descriși aici anticorpi anti-PSMA și molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA, cu caracteristici de legare dependente de pH. De exemplu, un anticorp anti-PSMA poate prezenta legare redusă la PSMA la pH acid în comparație cu pH neutru. Alternativ, anticorpii anti-PSMA

pot prezenta legare sporită la PSMA 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, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 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 de 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 PSMA la pH acid în comparație cu pH neutru” în scopurile prezentei invenții dacă anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia prezintă un raport acid/neutru K_D de aproximativ 3,0 sau mai mare. În anumite exemple de realizare, raportul K_D acid/neutru pentru un anticorp sau un fragment de legare la antigen al prezentei invenții poate fi de aproximativ 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 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 unuia 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 în raport cu pH-ul neutru.

Anticorpi Cuprinzând Variante Fc

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, sunt furnizați anticorpi anti-PSMA și moleculele bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA 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, prezenta invenție include 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, 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, 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. Într-o variantă de realizare, 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, prezenta invenție include anticorpi anti-PSMA și molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA, 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).

Caracteristicile Biologice ale Anticorpilor și Moleculelor Bispecifice de Legare la Antigen

Prezenta invenție include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă PSMA umană cu afinitate ridicată (de exemplu, valori K_D sub-nanomolare).

Conform anumitor variante de realizare, prezenta invenție include anticorpi și fragmente de anticorpi care leagă antigenul legând PSMA umană (de exemplu, la 37°C) cu un K_D mai mic de aproximativ 80 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de test așa cum este definit în Exemplul 3 de aici. Anticorpii sau fragmentele care leagă antigenul pot lega PSMA cu un K_D mai mic de aproximativ 5 nM, mai mic de aproximativ 2 nM, mai mic de aproximativ 1 nM, mai mic de aproximativ 800 pM, mai mic de aproximativ 600 pM, mai mic de aproximativ 500 pM, mai mic de aproximativ 400 pM, mai mic de aproximativ 300 pM, mai mic de aproximativ 200 pM, mai mic de aproximativ 180 pM, mai mic de aproximativ 160 pM, mai mic de aproximativ 140 pM, mai mic de aproximativ 120 pM, mai mic de aproximativ 100 pM, mai mic de aproximativ 80 pM, mai mic de

aproximativ 60 pM, mai mic de aproximativ 40 pM, mai mic de aproximativ 20 pM sau mai mic de aproximativ 10 pM, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici (de exemplu, formatul de captare a mAb sau de captare a antigenului), sau un test substanțial similar.

Sunt descriși, de asemenea, anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă PSMA cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 1 minut sau mai mare de aproximativ 10 minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 37°C, de exemplu, utilizând un format de test așa cum este definit în Exemplul 3 de aici, sau un test substanțial similar. Anticorpii sau fragmentele de legare a antigenului din prezenta invenție leagă PSMA cu un $t_{1/2}$ 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 200 de minute, mai mare de aproximativ 300 de minute, mai mare de aproximativ 400 de minute, mai mare de aproximativ 500 de minute, mai mare de aproximativ 600 de minute, mai mare de aproximativ 700 de minute, mai mare de aproximativ 800 de minute, mai mare de aproximativ 900 de minute, mai mare de aproximativ 1 000 de minute sau mai mare de aproximativ 1 100 de minute, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C sau 37°C, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici (de exemplu, format de captare mAb sau de captare a antigenului), sau un test substanțial similar. Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare la antigen (de exemplu, anticorpi bispecfici) care sunt capabile să se lege simultan la CD3 uman și PSMA uman. Conform anumitor variante de realizare, moleculele bispecifice de legare la antigen ale invenției interacționează în mod specific cu celulele care exprimă CD3 și/sau PSMA. Măsura în care o moleculă bispecifică de legare a antigenului leagă celulele care exprimă CD3 și/sau PSMA poate fi evaluată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS), așa cum este ilustrat în Exemplul 5 de aici. De exemplu, prezenta invenție include molecule bispecifice de legare a antigenului care leagă în mod specific liniile de celule T umane care exprimă CD3 (astfel de linii celulare nu exprimă PSMA, de exemplu, Jurkat) și/sau linii umane care exprimă PSMA (astfel de linii celulare nu exprimă CD3, de exemplu, B16F10.9/hPSMA sau 22RV1). Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare la antigen care leagă oricare dintre celulele și liniile celulare menționate mai sus cu o valoare EC_{50} de aproximativ 80 nM sau mai puțin, așa cum s-a determinat utilizând un test FACS așa cum este prezentat în Exemplul 5 sau un test substanțial similar.

Prezenta invenție include, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA care se leagă la celulele T umane care exprimă CD3 (de exemplu, Jurkat) și/sau celulele care exprimă PSMA cu o valoare EC_{50} cuprinsă între 1,0 pM și 1000 nM. Moleculele bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA se leagă la celulele T umane care exprimă CD3 cu o valoare EC_{50} cuprinsă între 1 nM și 60 nM. De exemplu, sunt descrise aici molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA care se leagă la celulele T umane care exprimă CD3 (de exemplu, Jurkat) și/sau celulele care exprimă PSMA cu o valoare EC_{50} de aproximativ 1 pM, aproximativ 10 pM, aproximativ 100 pM, aproximativ 500 pM, aproximativ 1 nM, aproximativ 2 nM, aproximativ 5 nM, aproximativ 10 nM, aproximativ 20 nM, aproximativ 30 nM, aproximativ 40 nM, aproximativ 50 nM, aproximativ 60 nM, aproximativ 70 nM, aproximativ 80 nM, aproximativ 90 nM, aproximativ 100 nM, aproximativ 200 nM, aproximativ 300 nM, aproximativ 500 nM, aproximativ 800 nM, aproximativ 1000 nM sau mai mult.

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

Sunt prezentați aici anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă CD3 uman cu afinitate mare. Prezenta invenție 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. 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, PSMA), poate fi de dorit ca brațul de legare a antigenului țintă să lege antigenul țintă cu afinitate în timp ce brațul anti-CD3 leagă doar CD3 cu afinitate moderată sau scăzută. 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 invenție include molecule bispecifice de legare a antigenului (de exemplu, anticorpi bispecifici) care sunt capabile să se lege simultan la CD3 uman și la un PSMA 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 PSMA 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 bispecifici ai acestora care leagă în mod specific liniile de celule T umane care exprimă CD3, dar nu exprimă PSMA (de exemplu, Jurkat), celule T de primat (de exemplu, sângele periferic cynomolgus, celule mononucleare [PBMC]) și/sau celule care exprimă PSMA. Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare a antigenului care leagă oricare dintre celulele T și liniile de celule T menționate mai sus cu o valoare EC_{50} de la aproximativ $1,8 \times 10^{-8}$ (18 nM) până la aproximativ $2,1 \times 10^{-7}$ (210 nM), sau mai mult (adică, afinitate mai slabă) sau EC_{50} este nedetectabilă, așa cum s-a determinat folosind un test de legare FACS, așa cum este prezentat în Exemplul 5 sau un test substanțial similar. Anticorpul, fragmentele de legare la antigen și anticorpii bispecifici din prezenta invenție leagă CD3 cu un EC_{50} mai mare de aproximativ 30 nM, mai mare de aproximativ 40 nM, mai mare de aproximativ 45 nM, mai mare de aproximativ 50 nM, mai mare de aproximativ 55 nM, mai mare de aproximativ 60 nM, mai mare de aproximativ 65 nM, mai mare de aproximativ 70 nM, mai mare de aproximativ 75 nM, cel puțin 80 nM, mai mare de aproximativ 90 nM, mai mare de aproximativ 100 nM, mai mare de aproximativ 110 nM, cel puțin 120 nM, mai mare de aproximativ 130 nM, mai mare de aproximativ 140 nM, mai mare de aproximativ 150 nM, cel puțin 160 nM, mai mare de aproximativ 170 nM, mai mare de aproximativ 180 nM, mai mare de aproximativ 190 nM, mai mare de aproximativ 200 nM, mai mare de aproximativ 250 nM, mai mare de aproximativ 300 nM, mai mare de aproximativ 1 μ M, mai mare de aproximativ 2 μ M sau mai mare de aproximativ 3 μ M, sau nicio afinitate detectabilă, măsurată prin legarea FACS, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 5 de aici, sau un test substanțial similar.

Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecifici ai acestora care se leagă la celulele și liniile celulare care exprimă PSMA, cu o valoare EC_{50} mai mică sau egală cu 5,6 nM ($5,6 \times 10^{-9}$), așa cum a fost determinată folosind un test de legare FACS așa cum este prezentat în Exemplul 5 sau un test substanțial similar.

Prezenta invenție include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecifici ai acestora care leagă CD3 uman cu afinitate slabă (adică scăzută) sau chiar non detectabilă. Conform anumitor aspecte, prezenta invenție include anticorpi și fragmente de anticorpi de legare la antigenul care leagă CD3 uman (de exemplu, la 37°C) cu un K_D mai mare de aproximativ 11 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de test așa cum este definit în Exemplul 6 de aici. Anticorpul sau fragmentele de legare la antigen din pot lega CD3 cu un K_D mai mare de aproximativ 15 nM, mai mare de aproximativ 20 nM, mai mare de aproximativ 25 nM, mai mare de aproximativ 30 nM, mai mare de aproximativ 35 nM, mai mare de aproximativ 40 nM, mai mare de aproximativ 45 nM, mai mare de aproximativ 50 nM, mai mare de aproximativ 55 nM, mai mare de aproximativ 60 nM, mai mare de aproximativ 65 nM, mai mare de aproximativ 70 nM, mai mare de aproximativ 75 nM, cel puțin 80 nM, mai mare de aproximativ 90 nM, mai mare de aproximativ 100 nM, mai mare de aproximativ 110 nM, cel puțin 120 nM, mai mare de aproximativ 130 nM, mai mare de aproximativ 140 nM, mai mare de aproximativ 150 nM, cel puțin 160 nM, mai mare de aproximativ 170 nM, mai mare de aproximativ 180 nM, mai mare de aproximativ 190 nM, mai mare de aproximativ 200 nM, mai mare de aproximativ 250 nM, mai mare de aproximativ 300 nM, mai mare de aproximativ 1 μ M, mai mare de aproximativ 2 μ M sau mai mare de aproximativ 3 μ M, sau nicio afinitate detectabilă, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 6 de aici (de exemplu, formatul de captare a mAb sau de captare a antigenului), sau un test substanțial similar.

Prezenta invenție include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecifici ai acestora care leagă CD3 de maimuță (adică cynomolgus) cu afinitate slabă (adică scăzută) sau chiar fără afinitate detectabilă. Conform anumitor variante de realizare, prezenta invenție include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecifici ai acestora care leagă CD3 uman (de exemplu, la 37°C) cu un K_D mai mare de aproximativ 10 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format test așa cum este definit în Exemplul 6 de aici. În anumite exemple de realizare, anticorpul sau fragmentele de legare la antigen din prezenta invenție leagă CD3 cu un K_D mai mare de aproximativ 15 nM, mai mare de aproximativ 20 nM, mai mare de aproximativ 25 nM, mai mare de aproximativ 30 nM, mai mare de aproximativ 35 nM, mai mare de aproximativ 40 nM, mai mare de aproximativ 45 nM, mai mare de aproximativ 50 nM, mai mare de aproximativ 55 nM, mai mare de aproximativ 60 nM, mai mare de aproximativ 65 nM, mai mare de aproximativ 70 nM, mai mare de

aproximativ 75 nM, cel puțin 80 nM, mai mare de aproximativ 90 nM, mai mare de aproximativ 100 nM, mai mare de aproximativ 110 nM, cel puțin 120 nM, mai mare de aproximativ 130 nM, mai mare de aproximativ 140 nM, mai mare de aproximativ 150 nM, cel puțin 160 nM, mai mare de aproximativ 170 nM, mai mare de aproximativ 180 nM, mai mare de aproximativ 190 nM, mai mare de aproximativ 200 nM, mai mare de aproximativ 250 nM, mai mare de aproximativ 300 nM, mai mare de aproximativ 1 μ M, mai mare de aproximativ 2 μ M sau mai mare de aproximativ 3 μ M, sau nicio afinitate detectabilă, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 6 de aici (de exemplu, formatul de captare a mAb sau de captare a antigenului), sau un test substanțial similar.

Prezenta invenție include anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici ai acestora care leagă CD3 uman și induc activarea celulelor T. De exemplu, prezenta invenție include anticorpi anti-CD3 care induc activarea celulelor T umane cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 113 pM, măsurată printr-un test de activare a celulelor T *in vitro*, de exemplu, utilizând formatul de analiză definit în Exemplul 7 aici [de exemplu, evaluarea procentului de celule activate (CD69+) din totalul celulelor T (CD2+) în prezența anticorpilor anti-CD3], sau un test substanțial similar care evaluează celulele T în starea lor activată. În anumite exemple de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale prezentei invenții induc activarea celulelor T umane [de exemplu, procent de celule T activate (CD69+) cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 100 pM, mai puțin de aproximativ 50 pM, mai puțin de aproximativ 20 pM, mai puțin de aproximativ 19 pM, mai puțin de aproximativ 18 pM, mai puțin de aproximativ 17 pM, mai puțin de aproximativ 16 pM, mai puțin de aproximativ 15 pM, mai puțin de aproximativ 14 pM, mai puțin de aproximativ 13 pM, mai puțin de aproximativ 12 pM, mai puțin de aproximativ 11 pM, mai puțin de aproximativ 10 pM, mai puțin de aproximativ 9 pM, mai puțin de aproximativ 8 pM, mai puțin de aproximativ 7 pM, mai puțin de aproximativ 6 pM, mai puțin de aproximativ 5 pM, mai puțin de aproximativ 4 pM, mai puțin de aproximativ 3 pM, mai puțin de aproximativ 2 pM sau mai puțin de aproximativ 1 pM, așa cum este măsurat printr-un test de activare a celulelor T *in vitro*, de exemplu, folosind formatul de test definit în Exemplul 7 de aici, sau un test substanțial similar. Anticorpii anti-CD3 care au legare slabă sau inexistentă la CD3 au capacitatea de a induce activarea celulelor T cu potență mare (adică. pM), în ciuda faptului că are afinitate de legare slabă sau inexistentă la CD3, așa cum este exemplificat în Exemplul 7 de aici.

Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici care leagă CD3 uman și induc uciderea mediată de celulele T a celulelor care exprimă antigenul tumoral. De exemplu, prezenta invenție include anticorpi anti-CD3 care induc uciderea mediată de celule T a celulelor tumorale cu un EC_{50} mai mic de aproximativ 1,3 nM, așa cum este măsurat într-un test *in vitro* de ucidere a celulelor tumorale mediata de celule T, de ex. folosind formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 7 de aici (de exemplu, evaluarea gradului de ucidere a celulelor care exprimă PSMA de către PBMC-uri umane în prezența anticorpilor anti-CD3) sau un test substanțial similar. În anumite variante de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale prezentei invenții induc uciderea celulelor tumorale mediata de celule T (de exemplu, uciderea mediata de PBMC a celulelor C4-2, 22Rv1 și TRAMPC2_PSMA) cu o valoare EC_{50} mai mică de aproximativ 1 nM, mai puțin de aproximativ 400 pM, mai puțin de aproximativ 250 pM, mai puțin de aproximativ 100 pM, mai puțin de aproximativ 50 pM, mai puțin de aproximativ 40 pM, mai puțin de aproximativ 30 pM, mai puțin de aproximativ 20 pM, mai puțin de aproximativ 10 pM, mai puțin de aproximativ 9 pM, mai puțin de aproximativ 8 pM, mai puțin de aproximativ 7 pM, mai puțin de aproximativ 6 pM, mai puțin de aproximativ 5 pM, mai puțin de aproximativ 4 pM, mai puțin de aproximativ 3 pM, mai puțin de aproximativ 2 pM sau mai puțin de aproximativ 2 pM, sau mai puțin de aproximativ 1 pM, măsurat printr-un test *in vitro* de ucidere a celulelor tumorale mediate de celule T, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 7 de aici, sau un test substanțial similar. Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici care leagă CD3 uman și/sau de maimuță (adică cynomolgus) cu afinitate slabă (adică scăzută) sau chiar deloc detectabilă (adică nu se leagă sau nu prezintă afinitate detectabilă) și induce uciderea mediata de celulele T a celulelor care exprimă antigenul tumoral.

Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi, fragmente de legare la antigen și anticorpi bispecfici care leagă CD3 cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mic de aproximativ 10 minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C sau 37°C, de exemplu, folosind un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 6 de aici, sau un test substanțial similar. În anumite variante de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale prezentei invenții leagă CD3 cu un $t_{1/2}$ mai mic de aproximativ 9 minute, mai mic de aproximativ 8 minute, mai mic de aproximativ 7 minute, mai mic de aproximativ 6 minute, mai mic de aproximativ 5 minute, mai puțin de aproximativ 4 minute, mai puțin de aproximativ 3 minute, mai puțin de aproximativ 2 minute, mai puțin de aproximativ 1,9 minute

sau mai puțin de aproximativ 1,8 minute sau prezintă foarte slab sau non detectabilă legarea măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C sau 37°C, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 6 de aici (de exemplu, formatul de captare a mAb sau de captare a antigenului) sau un test substanțial similar.

Moleculele bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA pot prezenta în plus una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din: (a) inducerea proliferării PBMC *in vitro*; (b) activarea celulelor T prin inducerea eliberării IFN-gamma și reglarea în creștere a CD25 în sângele integral uman; și (c) inducerea citotoxicității mediate de celule T pe linii celulare rezistente la anti-PSMA.

Prezenta invenție include molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA care sunt capabile să epuizeze celulele care exprimă antigenul tumoral la un subiect (vezi, de exemplu, Exemplul 8). De exemplu, în conformitate cu anumite exemple de realizare, sunt furnizate molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA, în care o singură administrare a 1 μg, sau 10 μg, sau 100 μg de moleculă bispecifică de legare a antigenului la un subiect (de ex. , la o doză de aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,08 mg/kg, aproximativ 0,06 mg/kg, aproximativ 0,04 mg/kg, aproximativ 0,02 mg/kg, aproximativ 0,01 mg/kg sau mai puțin) cauzează o reducere a numărului de celule care exprimă PSMA la subiect (de exemplu, creșterea tumorii la subiect este suprimată sau inhibată) sub nivelurile detectabile. În anumite realizări, o singură administrare a moleculei bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA la o doză de aproximativ 0,4 mg/kg determină o reducere a creșterii tumorii la subiect sub nivelurile detectabile la aproximativ ziua 7, aproximativ ziua 6, aproximativ ziua 5, aproximativ ziua 4, aproximativ ziua 3, aproximativ ziua 2 sau aproximativ ziua 1 după administrarea moleculei bispecifice de legare a antigenului la subiect. Conform anumitor variante de realizare, o singură administrare a unei molecule bispecifice de legare a antigenului anti-CD3/anti-PSMA conform invenției, la o doză de cel puțin aproximativ 0,01 mg/kg, face ca numărul de celule tumorale care exprimă PSMA să rămână mai mic. niveluri detectabile până la cel puțin aproximativ 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile, 12 zile, 13 zile, 14 zile, 15 zile, 16 zile, 17 zile sau mai mult, după administrare. Așa cum este utilizată aici, expresia "sub niveluri detectabile" înseamnă că nicio celulă tumorală nu poate fi detectată direct sau indirect crescând subcutanat la un subiect utilizând metode standard de măsurare cu caliper, de exemplu, așa cum este prezentat în Exemplul 8, aici.

Prezenta invenție include, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA care prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din: (a) inhibarea creșterii tumorii la șoarecii imunodeprimați purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman; (b) inhibarea creșterii tumorii la șoarecii imunocompetenți purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman; (c) suprimarea creșterii tumorii la tumorile stabilite la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman; și (d) reducerea creșterii tumorii la tumorile stabilite la șoarecii imunocompetenți purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman (vezi, de exemplu, Exemplul 8). Sunt de asemenea descrise aici, molecule bispecifice de legare la antigen anti-CD3/anti-PSMA care prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din: (a) induce creșteri tranzitorii dependente de doză ale citokinelor circulante, (b) induce creșteri tranzitorii ale celulele T circulante și (c) nu epuizează celulele T efectoare (de ex. Celule T CD4+, celule T CD8+ și celule T reglatoare, de ex. Tregs).

Cartografierea Epitopilor și Tehnologiile Conexce

Epitopul de pe CD3 și/sau PSMA la care se leagă moleculele de legare a antigenului din prezenta invenție poate consta dintr-o singură secvență adiacentă de 3 sau mai mulți (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 PSMA. Alternativ, epitopul poate consta dintr-o multitudine de aminoacizi non-contigui (sau secvențe de aminoacizi) ai CD3 sau PSMA. Anticorpul conform invenției 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 în Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), analiza mutațională cu scanare alaninei, analiza pe peptide blot (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 să aibă loc schimbul hidrogen-deuteriu 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 resturile 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. Chem. 73:256A-265A. Cristalografia cu raze X a complexului antigen/anticorp poate fi de asemenea utilizată în scopuri de cartografiere a epitopilor.

Prezenta invenție include în plus anticorpi anti-PSMA care se leagă la același epitop ca oricare dintre anticorpii exemplificativi specifici descriși aici (de ex.

anticorpi care cuprind oricare dintre secvențele de aminoacizi așa cum sunt prezentate în Tabelul 1 de aici). De asemenea, prezenta invenție include anticorpi anti-PSMA care concurează pentru legarea la PSMA cu oricare dintre anticorpii exemplificativi specifici descriși aici (de exemplu, anticorpi cuprinzând oricare dintre secvențele de aminoacizi, așa cum este prezentat în Tabelul 1 de aici).

Prezenta invenție 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 CD3 cynomolgus cu afinitate de legare scăzută sau detectabilă și un al doilea domeniu de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA uman, în care primul domeniu de legare la antigen se leagă la același epitop de pe CD3 ca oricare dintre domeniile specifice de legare a antigenului CD3 exemplificative descrise aici și/sau în care al doilea domeniu de legare a antigenului se leagă la același epitop de pe PSMA ca oricare dintre exemplele specifice de PSMA - domenii specifice de legare a antigenului descrise aici.

De asemenea, prezenta invenție include, de asemenea, molecule bispecifice de legare la antigen care cuprind 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 PSMA uman, în care primul domeniu de legare la antigen concurează pentru legarea la CD3 cu oricare dintre exemplele specifice de domenii de legare a antigenului CD3 descrise aici și/sau în care al doilea domeniu de legare a antigenului concurează pentru legarea la PSMA cu oricare dintre exemplele specifice de domenii de legare a antigenului specifice PSMA 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 acesteia se leagă de același epitop ca, sau concurează pentru legarea cu, o moleculă de legare a antigenului de referință din prezenta invenție prin utilizarea metodelor de rutină cunoscute în domeniu. De exemplu, pentru a determina dacă un anticorp de testat se leagă de același epitop pe PSMA (sau CD3) ca o moleculă de referință bispecifică de legare a antigenului din prezenta invenție, moleculei bispecifice de referință i se permite mai întâi să se lege la o proteină PSMA (sau proteină CD3).

Apoi, este evaluată capacitatea unui anticorp de testat de a se lega la molecula PSMA (sau CD3). Dacă anticorpul de testat este capabil să se lege la PSMA (sau CD3) în urma legăturii prin saturație cu molecula bispecifică de referință de legare la antigen, se poate concluziona că anticorpul de testat se leagă la un epitop diferit de PSMA (sau CD3) decât molecula de legare la antigenul bispecific de referință. Pe de altă parte, dacă anticorpul de testat nu este capabil să se lege la molecula PSMA (sau CD3) în urma legăturii prin saturație cu molecula bispecifică de referință de legare la antigen, atunci anticorpul testat se poate lega de același epitop de PSMA (sau CD3) ca epitop legat de molecula bispecifică de referință de legare la antigen a invenției. Experimentarea suplimentară de rutină (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 blocarea sterică (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. 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 proteină de legare la antigen inhibă legarea 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 de suprapuneri” dacă doar 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 PSMA (sau proteină CD3) în condiții de saturare urmată de evaluarea legării anticorpului de testat la molecula PSMA (sau CD3). Într-o a doua orientare, anticorpul de testat este lăsat să se lege la o moleculă PSMA (sau CD3) în condiții de saturare urmată de evaluarea legării moleculei de legare a antigenului de referință la molecula PSMA (sau CD3). Dacă, în ambele orientări, numai prima moleculă (care saturează) de legare a antigenului este capabilă să se lege de molecula PSMA (sau CD3), atunci se ajunge la concluzia că anticorpul de testat și molecula de referință de legare a antigenului concurează pentru legarea la PSMA (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 legând un epitop suprapus sau adiacent.

Prepararea Domeniilor de Legare a Antigenului și Construcția Moleculor 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 a antigenului, specifice pentru doi antigeni diferiți (de exemplu, CD3 și PSMA), pot fi aranjate în mod corespunzător unul față de celălalt pentru a produce o moleculă bispecifică de legare a antigenului din prezenta invenție 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 din prezenta invenție este furnizată în altă parte aici). În anumite exemple de realizare, 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 himerici, 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 din prezenta invenție pot fi preparate utilizând tehnologia VELOCIMMUNE™. Folosind tehnologia VELOCIMMUNE™ (sau orice altă tehnologie de generare a anticorpilor umani), anticorpii himerici de mare afinitate la un anumit antigen (de exemplu, CD3 sau PSMA) 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 din prezenta invenție.

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 a lanțului ușor al imunoglobulinei de șoarece endogen, în care șoarecele exprimă doar unul sau două domenii variabile ale lanțului ușor uman codificate de secvențe de imunoglobulină umană legate operabil la gena constantă kappa de șoarece 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 pentru o discuție detaliată a unor astfel de șoareci modificați și utilizarea acestora pentru a produce molecule bispecifice de legare a antigenului).

Bioechivalenți

Sunt dezvaluite în prezenta 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 PSMA. Astfel de molecule variate 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 invenție 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 în doză unică fie în doză multiplă. 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 etichetare, nu sunt esențiale pentru atingerea concentrațiilor efective ale medicamentului în organism, de exemplu, pentru utilizarea cronică și sunt considerate nesemnificative din punct de vedere medical pentru produsul medicamentos studiat.

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

Două proteine care leagă antigenul sunt bioechivalente dacă unui pacient i se poate schimba o dată sau de mai multe ori produsul de referință cu 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.

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 este în mod rezonabil predictibil 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 exemplificative 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 realizări ale invenției, sunt furnizate 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 PSMA uman, dar nu la PSMA de la alte specii. Prezentă invenție 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 PSMA uman și la PSMA de la una sau mai multe specii non-umane.

Conform anumitor exemple de realizare ale invenției, sunt furnizate molecule de legare la antigen care se leagă la CD3 uman și/sau PSMA 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 PSMA. De exemplu, sunt descrise 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 PSMA uman.

Imunoconjugate

Prezentă invenție cuprinde molecule de legare a antigenului conjugate la un fragment terapeutic ("imunoconjugat"), cum ar fi o citotoxină, un medicament chimioterapeutic, un imunosupresor sau un radioizotop. Agenții citotoxici includ orice agent care dăunează celulelor. Exemple de agenți citotoxici adecvați și agenți chimioterapeutici pentru formarea imunoconjugatelor sunt cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, WO 05/103081).

Formulare și Administrare Terapeutică

Prezenta invenție furnizează compoziții farmaceutice care cuprind moleculele de legare la antigen ale prezentei invenții. Compozițiile farmaceutice ale invenției sunt formulate cu purtători adecvați, excipienți și alți agenți care asigură transfer, livrare, toleranță și altele asemenea îmbunătățite. O

5 multitudinea 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,

10 paste de absorbție anhidre, emulsii ulei-în-apă și apă-în-ulei, emulsii carbowax (polietilenglicoli de diferite greutăți moleculare), geluri semi-solide și amestecuri semi-solide care conțin carbowax. Vezi, de asemenea, Powell și colab., "Compendium of excipients for parenteral formulations" 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 talia pacientului, boala țintă, condițiile, calea de administrare și altele asemenea. Doza preferată

15 este de obicei calculată în funcție de greutatea corporală sau suprafața corpului. Când o moleculă bispecifică de legare a antigenului din prezenta invenție 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

20 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 folosind metode binecunoscute în

25 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 a invenției, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime virusurile mutante, endocitoza mediată de receptor (vezi, de exemplu, Wu și colab., 1987, J. Biol. Chim. 262:4429-4432). Metodele de introducere includ, dar nu se limitează

30 la, căile intradermice, intramusculare, intraperitoneale, intravenoase, subcutanate, intranasale, 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 a prezentei invenții 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

40 înlocuibil care conține o compoziție farmaceutică. Odată ce toată compoziția farmaceutică din cartuș a fost administrată 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 injectorului 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 acestea, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Marea

50 Britanie), stilou injector DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Elveția), stilou HUMALOG MIX 75/25™, stilou 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,

55 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 a prezentei invenții 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 a numi doar câteva.

În anumite situații, compoziția farmaceutică poate fi eliberată într-un sistem de eliberare controlată. Poate fi utilizată o pompă (vezi Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. ing. 14:201). Pot fi utilizate materiale polimerice; vezi, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. 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, vol. 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, polisorbitat 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 invenție include metode care cuprind administrarea unui subiect care are nevoie de aceasta a unei compoziții terapeutice cuprinzând un anticorp anti-PSMA sau un fragment al acestuia de legare la antigen, sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific CD3 și PSMA. Compoziția terapeutică poate cuprinde oricare dintre anticorpii sau moleculele bispecifice de legare a antigenului așa cum sunt dezvăluite 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 PSMA sau o epuizare a celulelor PSMA+ {de exemplu, celulele cancerului de prostată}.

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

Moleculele de legare a antigenului din prezenta invenție pot fi utilizate pentru a trata, de exemplu, tumori primare și/sau metastatice care apar în tractul gastrointestinal, prostată, rinichi și/sau vezică urinară. În anumite variante de realizare, moleculele bispecifice de legare la antigen ale invenției sunt utilizate pentru a trata unul sau mai multe dintre următoarele tipuri de cancer: carcinom cu celule renale clare, carcinom cu celule renale cromofob, oncocitom (renal), carcinom cu celule tranzitionale (renal), cancer de prostată, cancer colorectal, cancer gastric, carcinom urotelial, adenocarcinom (vezicii urinare) sau carcinom cu celule mici (vezicii urinare). Anticorpii anti-PSMA sau anticorpii bispecifici anti-PSMA/anti-CD3 sunt utili pentru tratarea unui pacient afectat de cancer de prostată rezistent la castrare. Conform altor realizări înrudite ale invenției, sunt furnizate metode care cuprind administrarea

unui anticorp anti-PSMA sau a unei molecule de legare antigen bispecific anti-CD3/anti-PSMA așa cum este dezvăluit aici unui pacient care este afectat de cancer de prostată rezistent la castrare. Metodele analitice/diagnostic cunoscute în domeniu, cum ar fi scanarea tumorii etc., pot fi utilizate pentru a stabili dacă un pacient prezintă o tumoare care este rezistentă la castrare.

Prezenta invenție 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 invenție furnizează metode pentru tratarea unei boli sau tulburări asociate cu expresia PSMA (de exemplu, cancerul de prostată) cuprinzând administrarea uneia sau mai multor molecule anti-PSMA 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, cancer de prostată rezistent la castrare). De exemplu, metode pentru tratarea cancerului de prostată cuprinzând administrarea unui anticorp anti-PSMA sau a unei molecule de legare bispecifică a antigenului anti-CD3/anti-PSMA la un pacient 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-androgen) sunt descrise aici.

Terapii și Formulări Combinat

Sunt dezvaluite aici metode care cuprind administrarea unei compoziții farmaceutice cuprinzând oricare dintre anticorpii exemplificativi 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 includ, de exemplu, un antagonist EGFR (de exemplu, un anticorp anti-EGFR [de exemplu, cetuximab sau panitumumab] sau un 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 activitatea ErbB4), un antagonist al EGFRvIII (de exemplu, un anticorp care se leagă în mod specific EGFRvIII), un anagonist cMET (de exemplu, un anticorp anti-cMET), un antagonist IGF1R (de exemplu, un anticorp anti-IGF1R), un 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, o capcană VEGF, vezi, de exemplu, US 7,087,411 (denumită aici și „proteina de fuziune care inhibă VEGF”), n”), 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 dezvăluit în US 2009/0142354 cum ar fi REGN421), un antagonist Ang2 {de exemplu, un anticorp anti-Ang2 dezvăluit 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 TMPRSS2 (de exemplu, un anticorp anti-TMPRSS2), 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 din invenție 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 ale prezentei invenții (de exemplu, compozițiile farmaceutice care cuprind o moleculă de legare antigenă bispecifică anti-CD3/anti-PSMA așa cum este dezvăluită 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 arabinozid, 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).

Sunt dezvaluite, 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, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, 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; fragment F(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 pot fi, de asemenea, administrate și/sau co-formulate în combinație cu antivirale, antibiotice, analgezice, corticosteroizi și/sau AINSD. 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.

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

10 Prezenta invenție 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) terapeutic așa cum este descris în altă parte aici.

Regimuri de Administrare

15 Conform anumitor exemple de realizare ale prezentei invenții, doze multiple dintr-o moleculă de legare a antigenului (de exemplu, un anticorp anti-PSMA sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA 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. Așa cum este utilizat aici, „administrarea secvențială” înseamnă că fiecare doză dintr-o moleculă de legare a antigenului este

20 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 invenție 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 de moleculă de legare a antigenului și, opțional, urmată de una sau mai multe doze terțiare de moleculă de legare a antigenului.

25 Termenii "doză inițială", "doze secundare" și "doze terțiare" se referă la secvența temporală de administrare a moleculei de legare a antigenului. 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

30 antigenului, dar în general pot diferi una de cealaltă în ceea ce privește frecvența administrării. În anumite exemple de realizare, 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 exemple de realizare, 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

35 sunt administrate pe o bază mai puțin frecventă {de exemplu, „doze de întreținere”}.

Într-un exemplu de realizare a prezentei invenții, 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

40 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 imediat următoare în secvența fără doze intermediare.

Metodele conform acestui aspect al invenției 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

45 anti-PSMA sau o moleculă bispecifică de legare a antigenului care leagă în mod specific PSMA și CD3). De exemplu, în anumite variante de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză secundară. În alte variante de realizare, pacientului i se administrează două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare. De asemenea, în anumite exemple de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză terțiară. În alte exemple de realizare, două sau mai multe (de

50 exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului.

În exemplele de realizare 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

55 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 după examenul clinic.

Utilizări pentru Diagnosticare ale Anticorpilor

Anticorpii anti-PSMA pot fi utilizați de asemenea pentru a detecta și/sau măsura PSMA, sau celule care exprimă PSMA într-o probă, de exemplu, în scopuri de diagnosticare. De exemplu, un anticorp anti-PSMA, sau un 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 PSMA. Testele de diagnostic exemplificative pentru PSMA pot cuprinde, de exemplu, punerea în contact a unei probe, obținută de la un pacient, cu un anticorp anti-PSMA, în care anticorpul anti-PSMA este marcat cu o moleculă marcatoare sau reporter detectabilă. Alternativ, un anticorp anti-PSMA nemarcat poate fi utilizat în aplicații de diagnosticare în combinație cu un anticorp secundar care este el însuși marcat detectabil. Eticheta detectabilă sau molecula reporter poate fi un radioizotop, cum ar fi ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S sau ^{125}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-PSMA include anticorpi marcați cu ^{89}Zr , cum ar fi marcați cu ^{89}Zr -desferioxamină, în scopul identificării și urmăririi neinvazive a celulelor tumorale la un subiect (de ex. imagistica tomografiei cu emisie de pozitroni (PET)). (A se vedea, de exemplu, Tavare, R. și colab. Cancer Res. 2016 1 ian;76(1):73-82; și Azad, BB. și colab. Oncotarget. 2016 Mar 15;7(11):12344-58.) Testele exemplificative specifice care pot fi utilizate pentru a detecta sau măsura PSMA într-o probă includ testul imunisorbent legat de enzime (ELISA), radioimunotestul (RIA) și sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS).

Probele care pot fi utilizate în testele de diagnosticare PSMA conform prezentei invenții includ orice probă de țesut sau fluid obținută de la un pacient care conține cantități detectabile de proteină PSMA, sau fragmente ale acesteia, în condiții normale sau patologice. În general, nivelurile de PSMA dintr-o probă particulară 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 PSMA) vor fi măsurate pentru a stabili inițial un nivel de bază sau standard de PSMA. Acest nivel de bază al PSMA poate fi apoi comparat cu nivelurile de PSMA măsurate în probe obținute de la indivizi suspectați de a avea o boală legată de PSMA (de exemplu, o tumoră care conține celule care exprimă PSMA) sau o afecțiune.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt prezentate astfel încât să ofere celor cu calificare obișnuită în domeniu o dezvăluire și o descriere completă a modului de realizare și utilizare a metodelor și compozițiilor invenției. 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 cea atmosferică.

Exemplul 1: Generarea de Anticorpi Anti-PSMA

Anticorpii anti-PSMA au fost obținuți prin imunizarea unui șoarece modificat genetic cu un antigen PSMA 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 PSMA uman.

Șoarecii au fost imunizați cu celule umane de cancer de prostată (LNCaP, ATTC®, Manassas, Virginia, SUA) care exprimă PSMA umană (SECV ID NR:1651;

UniProtKB/Swiss-Prot. nr. Q04609). După imunizare, splenocitele au fost recoltate de la fiecare șoarece și au fost fie (1) fuzionate cu celule de mielom de șoarece pentru a-și păstra viabilitatea și a forma celule de hibridom și analizate pentru specificitatea PSMA, fie (2) celule B sortate (așa cum este descris în US 2007/0280945A1) folosind un PSMA uman cu o etichetă 6-His N-terminală (R&D, Cat #4234-ZN) ca reactiv de sortare care leagă și identifică anticorpii reactivi (celule B pozitive pentru antigen).

Anticorpii himerici anti PSMA au fost inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii au fost caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, inclusiv afinitatea, selectivitatea etc. Dacă este necesar, regiunile constante de șoarece au fost înlocuite cu o regiune constantă umană dorită, de exemplu IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificat, pentru a genera un anticorp anti-PSMA 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 H1 H1 1453N2 și H1 M1 1900N, denotă anticorpi complet umani „HIH” sau anticorpi himerici umani variabili/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 anti-PSMA exemplificatoare generați în conformitate cu metodele din acest Exemplu sunt descrise în detaliu în Exemplele prezentate mai jos.

Exemplul 2: Secvențele de Aminoacizi și Acizi Nucleici din Regiunea Variabilă a Lanțului Greu și Ușor ale anticorpilor anti-PSMA

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

Tabelul 1: Identificatori de Secvență de Aminoacizi

	SEQ ID Nr:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11453N2	2	4	6	8	1642	1644	1646	1648
H1H11792P2	10	12	14	16	1642	1644	1646	1648
H1H11797P2	18	20	22	24	1642	1644	1646	1648
H1H11800P2	26	28	30	32	1642	1644	1646	1648
H1H11803P2	34	36	38	40	1642	1644	1646	1648
H1H11804P2	42	44	46	48	1642	1644	1646	1648
H1H11805P2	50	52	54	56	1642	1644	1646	1648
H1H11808P2	58	60	62	64	1642	1644	1646	1648
H1H11810P2	66	68	70	72	1642	1644	1646	1648
H1H11835P2	74	76	78	80	1642	1644	1646	1648
H1H11836P2	82	84	86	88	1642	1644	1646	1648
H1H11837P2	90	92	94	96	1642	1644	1646	1648
H1H11838P2	98	100	102	104	1642	1644	1646	1648
H1H11841P2	106	108	110	112	1642	1644	1646	1648
H1H11899N2	114	116	118	120	1642	1644	1646	1648
H1H3465P	122	124	126	128	130	132	134	136
H1M11900N	138	140	142	144	146	148	150	152

Tabelul 2: Identificatori de Secvență de Acid Nucleic

	SEQ ID Nr:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11453N2	1	3	5	7	1641	1643	1645	1647
H1H11792P2	9	11	13	15	1641	1643	1645	1647
H1H11797P2	17	19	21	23	1641	1643	1645	1647
H1H11800P2	25	27	29	31	1641	1643	1645	1647
H1H11803P2	33	35	37	39	1641	1643	1645	1647
H1H11804P2	41	43	45	47	1641	1643	1645	1647
H1H11805P2	49	51	53	55	1641	1643	1645	1647
H1H11808P2	57	59	61	63	1641	1643	1645	1647
H1H11810P2	65	67	69	71	1641	1643	1645	1647
H1H11835P2	73	75	77	79	1641	1643	1645	1647

H1H11836P2	81	83	85	87	1641	1643	1645	1647
H1H11837P2	89	91	93	95	1641	1643	1645	1647
H1H11838P2	97	99	101	103	1641	1643	1645	1647
H1H11841P2	105	107	109	111	1641	1643	1645	1647
H1H11899N2	113	115	117	119	1641	1643	1645	1647
H1H3465P	121	123	125	127	129	131	133	135
H1M11900N	137	139	141	143	145	147	149	151

Exemplul 3: Afinitățile de Legare Derivate prin Rezonanța Plasmonului de Suprafață și Constantele Cinetice ale Anticorpilor Monoclonali Umani anti-PSMA

În acest exemplu, anticorpul anti-PSMA a fost evaluat pentru capacitatea lor de a se lega de PSMA uman. Afinitățile de legare și constantele cinetice ale anticorpilor anti-PSMA la proteina PSMA umană solubilă au fost determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață la 37°C utilizând un format de captare a anticorpilor. Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 3 și 4. Măsurătorile au fost efectuate pe un instrument Biacore T-200 (GE Healthcare).

Pe scurt, o suprafață a senzorului CM5 Biacore a fost derivatizată prin cuplarea aminei cu un anticorp monoclonal de șoarece anti-Fc uman (GE, # BR-1008-39) sau anticorp monoclonal de capră anti-Fc de șoarece (GE, # BR-1008-38) pentru captarea anticorpilor anti-PSMA purificați. Studiile de legare au fost efectuate în tampon HBSP++ compus din 0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 2 mM Ca^{2+} , 2 mM Mg^{2+} , 0,05% v/v Surfactant P20, pH 7,4. Concentrații variate de PSMA uman exprimate cu o etichetă de hexahistidină N-terminală (6h.hPSMA, R&D) preparată în tampon de rulare HBSP++ (cuprinzând între 50 și 0,78 nM, diluții de 4 ori) au fost injectate pe suprafața captată de anticorp anti-PSMA la un debit de 30 $\mu\text{L}/\text{minut}$.

Asocierea anticorp-reactiv a fost monitorizată timp de 2 minute, în timp ce disocierea în tamponul de rulare HBSP++ a fost monitorizată timp de 8 minute.

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 (K_D) și timpii de înjumătățire disociativi ($t_{1/2}$) au fost calculați din constantele vitezei cinetice ca: $K_D(\text{M}) = k_d/k_a$; și $t_{1/2}(\text{min}) = (\ln 2)/(60 \cdot k_d)$.

Așa cum se arată în Tabelele 3 și 4, anticorpul anti-PSMA conform invenției s-au legat la PSMA uman în formatul de captare a anticorpilor cu afinități diferite și cu valori K_D variind de la 19,9 pM la 75,6 nM. Câțiva anticorpi anti-PSMA exemplificatori, cum ar fi H1 H3465P și H1H11810P2, au prezentat o afinitate puternică pentru proteina PSMA umană, cu valori K_D sub-nanomolare.

Tabelul 3: Afinitățile anticorpilor umani IgG1 anti-PSMA la PSMA uman solubil la 37°C

Antibody ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H3465P	2.67E+05	6.06E-05	2.27E-10	190.6
H1H11792P2	4.73E+05	9.70E-05	2.05E-10	119.1
H1H11797P2	1.68E+05	6.30E-04	3.74E-09	18.3
H1H11800P2	2.51E+05	4.10E-05	1.63E-10	281.8
H1H11803P2	4.57E+05	6.08E-04	1.33E-09	19
H1H11804P2	2.03E+04	8.01E-04	3.94E-08	14.4
H1H11805P2	1.29E+05	9.74E-03	7.56E-08	1.2
H1H11808P2	1.78E+05	$\leq 1\text{E}-05$	$\leq 5.63\text{E}-11$	≥ 1155
H1H11810P2	5.03E+05	$\leq 1\text{E}-05$	$\leq 1.99\text{E}-11$	≥ 1155
H1H11835P2	1.75E+05	2.46E-03	1.40E-08	4.7
H1H11836P2	3.27E+05	2.80E-04	8.55E-10	41.3
H1H11837P2	4.41E+05	7.34E-04	1.66E-09	15.7

H1H11838P2	2.37E+05	4.71E-04	1.99E-09	24.5
H1H11841P2	IC	IC	IC	IC
IC: neconcludent				

Tabelul 4: Afinitățile anticorpilor constanți de șoarece anti-PSMA la PSMA uman solubil la 37°C

ID Anticorp	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t _{1/2} (min)
H2M11899N	1.51E+05	2.65E-04	1.76E-09	43.6
H1M11453N	1.85E+05	3.56E-04	1.93E-09	32.4
H1M11900N	1.57E+05	4.06E-03	2.58E-08	2.8

Exemplul 4: Generarea de Anticorpi Bispecifici care Leagă Antigenul de Membrană Specific Prostatai (PSMA) și CD3

Prezenta invenție furnizează molecule bispecifice de legare a antigenului care leagă CD3 și antigenul de membrană specific prostatei (PSMA); astfel de molecule bispecifice de legare a antigenului sunt denumite aici, de asemenea, „molecule bispecifice anti-PSMA/anti-CD3”. Porțiunea anti-PSMA a moleculei bispecifice anti-PSMA/anti-CD3 este utilă pentru țintirea celulelor tumorale care exprimă PSMA, iar porțiunea anti-CD3 a moleculei bispecifice este utilă pentru activarea celulelor T. Legarea simultană a PSMA 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-PSMA și un domeniu de legare specific anti-CD3 au fost construiți folosind metodologii standard, în care domeniul de legare a antigenului anti-PSMA și domeniul de legare a antigenului anti-CD3 cuprind fiecare HCVR-uri diferite, distincte, asociate cu un LCVR comun. În unele cazuri, anticorpii bispecifici au fost construiți utilizând un lanț greu dintr-un anticorp anti-CD3, un lanț greu dintr-un anticorp anti-PSMA și un lanț ușor comun. În alte cazuri, anticorpii bispecifici au fost construiți utilizând un lanț greu dintr-un anti-Anticorp CD3, un lanț greu de la un anticorp anti-PSMA și un lanț ușor de la un anticorp anti-CD3.

Anticorpii bispecifici descriși în următoarele exemple constau din brațe de legare cunoscute că se leagă la proteina hCD3Oε/δ heterodimerică umană solubilă (așa cum este descris în Exemplele 9-13 de aici); și PSMA uman (vezi Exemplele 1-3 de mai sus). Anticorpii bispecifici exemplificați au fost fabricați având un domeniu Fc IgG4 modificat (himeric), așa cum este prezentat în publicația cererii de brevet US nr. US20140243504A1, publicată pe 28 august 2014.

Un rezumat al părților componente ale domeniilor de legare la antigen ale diferiților anticorpi bispecifici anti-PSMAxCD3 construiți este prezentat în Tabelul 5.

Tabelul 5: Rezumatul Părților Componente ale Anticorpilor Bispecifici PSMAxCD3

Identificator Bispecific Anticorpului	Anti-PSMA	Anti-CD3	Regiune Variabilă de Lanț Ușor
	Domeniul de Legare Antigen	Domeniul de Legare Antigen	
	Regiune Variabilă de Lanț Greu	Regiune Variabilă de Lanț Greu	
BSPSMA/CD3-001	PSMA-VH-3465	CD3-VH-A	CD3-VL-A
BSPSMA/CD3-002	PSMA- VH-3465	CD3-VH-B	CD3-VL-B
BSPSMA/CD3-003	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-200	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G2	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-300	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G3	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)

BSPSMA/CD3-400	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G4	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-004	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G5	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-800	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G8	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-900	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G9	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1000	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G10	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1100	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G11	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1200	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G12	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1300	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G13	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1400	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G14	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1500	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G15	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1600	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G16	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1700	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G17	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1800	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G18	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-1900	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G19	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-005	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G20	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)
BSPSMA/CD3-2100	PSMA-VH-11810	CD3-VH-G21	VK 1-39 JK 5 (SEQ ID NO:1386)

Regiunea variabilă a lanțului greu anti-PSMA PSMA-VH-3465 este HCVR din H1 H3465P (SEQ ID NR:122) din Tabelul 1. Regiunea variabilă a lanțului greu anti-PSMA PSMA-VH-11810 este HCVR din H1H1 1810P2 (SEQ ID NR:66) din Tabelul 1.

- 5 Regiunea variabilă a lanțului greu anti-CD3 CD3-VH-A este HCVR din H1 H15778P (SEQ ID NR:922) din Tabelul 12. Regiunea variabilă CD3-VH-B a lanțului greu anti-CD3 este HCVR din H1 H2712N (SEQ ID NR:154) din Tabelul 12.

- 10 Regiunile variabile ale lanțului greu anti-CD3 CD3-VH-G, CD3-VH-G2, CD3-VH-G3, CD3-VH-G4, CD3-VH-G5, CD3-VH-G8, CD3-VH-G9, CD3-VH-G10, CD3-VH-G11, CD3-VH-G12, CD3-VH-G13, CD3-VH-G14, CD3-VH-G15, CD3-VH-G16, CD3-VH-G17, CD3-VH-G18, CD3-VH-G19, CD3-VH-G20 și CD3-VH-G21 sunt descrise în Tabelul 18.

Lanțurile ușoare din Tabelul 5 au fost comune atât pentru brațele de țintire CD3, cât și pentru PSMA ale anticorpilor bispecfici. Regiunea variabilă CD3-VL-A a lanțului ușor anti-CD3 este LCVR din H1H5778P (SEQ ID NR:930) din Tabelul 12.

- 15 Regiunea variabilă CD3-VL-B a lanțului ușor anti-CD3 este LCVR din H1H2712N (SEQ ID NR:162) din Tabelul 12. Regiunea variabilă a lanțului ușor VK1-39 JK5 este SEQ ID NO: 1386 din Tabelul 20. Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi pentru diferitele regiuni variabile ale lanțului greu și CDR-urile corespunzătoare ale brațelor anti-PSMA ale anticorpilor bispecfici din acest Exemplu. Tabelul 2 prezintă identificatorii de secvență pentru secvențele de nucleotide care codifică

regiunile variabile ale lanțului greu, și CDR-urile lor corespunzătoare, ale domeniilor de legare la antigen anti-PSMA ale anticorpilor bispecfici din acest Exemplu.

Tabelele 12, 14, 15, 18 și 20 descriu secvențele de aminoacizi ale regiunilor variabile ale lanțului greu și CDR-urile corespunzătoare acestora, pentru brațele anti-CD3 ale anticorpilor bispecfici, precum și secvențele de aminoacizi pentru regiunile variabile ale lanțului ușor, și CDR-urile lor corespunzătoare, comune ambelor brațe ale anticorpilor bispecfici din acest Exemplu. Tabelele 13, 16, 17, 19 și 21 descriu secvențele de nucleotide corespunzătoare pentru aceste caracteristici ale anticorpilor bispecfici din acest Exemplu.

Exemplul 5: Afinitățile de Legare ale Anticorpilor Bispecfici Exemplificați, Măsurate prin Analiza FACS

În acest exemplu, a fost determinată capacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 descriși în Exemplul 4 de a se lega la liniile celulare care exprimă PSMA uman și la liniile celulare care exprimă CD3 umane și cynomolgus prin FACS.

Așa cum s-a descris mai sus, anticorpul bispecific al acestei invenții au utilizat un braț de legare a lanțului greu (HC) specific PSMA asociat cu un panou de brațe de legare HC anti-CD3 și un lanț ușor comun. Brațele de legare PSMA-HC din anticorpul bispecific, de mai jos, au demonstrat o legare puternică la proteina PSMA umană prin rezonanța plasmonului de suprafață (Exemplul 3). Așa cum este descris în Exemplele 6 și 13 de aici, brațele HC care leagă CD3 au prezentat, de asemenea, o gamă de afinități față de proteina hCD3s/6.mFc heterodimerică umană solubilă prin rezonanța plasmonului de suprafață.

Pe scurt, 2x10⁵ celule/godeu de Jurkat uman care exprimă CD3, cynomolgus T sau celule umane care exprimă PSMA specifice au fost incubate cu o diluție în serie de anticorpi bispecfici timp de 30 de minute la 4°C. După incubare, celulele au fost spălate și un F(ab')₂ anti-uman de capră marcat secundar cu Fcy PE (Jackson Immunolabs) a fost adăugat la celule pentru încă 30 de minute. Apoi, celulele au fost spălate, resuspendate în PBS rece + 1 % BSA și analizate prin citometrie în flux pe un BD FACS Canto II.

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. A fost determinat EC₅₀ pentru titrarea legării celulelor folosind software-ul Prism. Valorile au fost calculate utilizând analiza de regresie neliniară cu 4 parametri.

Tabelul 6: Legarea FACS pe liniile celulare specifice CD3 și PSMA

Identificator Anticorp Bispecific	Braț Legare Anti-CD3	Jurkat	CeluleT Cyno	B16F10.9/PSMA	22RV1
		EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]
BSPSMA/CD3-001	CD3-VH-A	3.91E-08	NT	NT	7.85E-08
BSPSMA/CD3-002	CD3-VH-B	NT	NT	NT	NT
BSPSMA/CD3-003	CD3-VH-G	1.65E-08	1.42E-08	2.26E-09	NT
BSPSMA/CD3-200	CD3-VH-G2	NB	NB	1.88E-09	NT
BSPSMA/CD3-300	CD3-VH-G3	NB	NB	1.90E-09	NT
BSPSMA/CD3-400	CD3-VH-G4	NB	NB	1.72E-09	NT
BSPSMA/CD3-004	CD3-VH-G5	-1.0E-06	NB	1.31E-09	NT
BSPSMA/CD3-800	CD3-VH-G8	1.93E-08	1.96E-08	1.31E-09	NT
BSPSMA/CD3-900	CD3-VH-G9	2.74E-07	NB	1.43E-09	NT

Identificator Anticorp Bispecific	Braț Legare Anti-CD3	Jurkat	CeluleT Cyno	B16F10.9/PSMA	22RV1
		EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]
BSPSMA/CD3-1000	CD3-VH-G10	2.77E-07	NB	1.19E-09	NT
BSPSMA/CD3-1100	CD3-VH-G11	1.83E-08	8.90E-07	1.03E-09	NT

BSPSMA/CD3-1200	CD3-VH-G12	4.72E-08	NB	1.16E-09	NT
BSPSMA/CD3-1300	CD3-VH-G13	1.02E-07	2.17E-06	1.25E-09	NT
BSPSMA/CD3-1400	CD3-VH-G14	3.19E-08	1.70E-07	1.30E-09	NT
BSPSMA/CD3-1500	CD3-VH-G15	9.30E-08	NB	1.21E-09	NT
BSPSMA/CD3-1600	CD3-VH-G16	5.68E-08	NB	1.03E-09	NT
BSPSMA/CD3-1700	CD3-VH-G17	2.00E-07	3.35E-06	1.34E-09	NT
BSPSMA/CD3-1800	CD3-VH-G18	1.26E-07	NB	2.16E-09	NT
BSPSMA/CD3-1900	CD3-VH-G19	6.07E-08	NB	1.35E-09	NT
BSPSMA/CD3-005	CD3-VH-G20	2.10E-07	6.14E-06	2.09E-09	NT
BSPSMA/CD3-2100	CD3-VH-G21	1.06E-07	NB	1.14E-09	NT
NB = fără legare; NT = non testat					

După cum se arată în Tabelul 6, anticorpii bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 testați au demonstrat specificitatea legării la liniile celulare B16F10.9/hPSMA și 22RV1 care exprimă PSMA uman prin FACS. Limita de detecție pentru legarea FACS este de 1 μ M EC50.

După cum se arată în Tabelul 6, brațele de legare CD3 ale fiecărui anticorp bispecific CD3xPSMA au prezentat o gamă de afinitate de legare a celulelor la celulele Jurkat care exprimă CD3 uman (interval EC50 de la 15 la 300 nM). Este important că brațele CD3 care au prezentat legare slabă până la deloc la proteina heterodimerică CD3 umană prin rezonanța plasmonului de suprafață (a se vedea Tabelul 7 de mai jos) s-au corelat, de asemenea, cu legare slabă până la deloc observabilă pe celulele Jurkat (de ex. CD3-VH-G2, CD3-VH-G3, CD3-VH-G5). Mai multe brațe care leagă CD3 au prezentat, de asemenea, reactivitate încrucișată la celulele T cynomolgus. Toți anticorpii bispecfici testați au afișat o legare celulară similară pe liniile celulare respective care exprimă PSMA, confirmând că împerecherea bispecifică cu brațele CD3 individuale nu a afectat sau diminuat legarea specifică PSMA (legarea specifică PSMA a fost mai mică sau egală cu 5,6 nM (afinitate mare) în toate exemplele testate).

Anticorpii care prezintă legare slabă până la deloc detectabilă la CD3 uman și, de asemenea, prezintă legare slabă la deloc la CD3 de cynomolgus, au fost considerați avantajoși pentru împerecherea bispecifică determinată de aviditate în conformitate cu prezenta invenție și au fost testați în continuare pentru citotoxicitate în teste *in vitro* și *in vivo*.

Exemplul 6: Afinitățile de legare ale anticorpilor exemplificați, măsurate printr-un test de legare prin rezonanță a plasmonului de suprafață

Afinitățile de legare și constantele cinetice ale anticorpilor bispecfici anti-PSMA x anti-CD3 la proteina heterodimerică solubilă hCD3 ϵ / δ .mFc (hCD3 ϵ = Uni ProtKB/Swiss-Prot: P07766.2; SEQ ID NR: 1652; hCD3 δ = Uni ProtKB/Swiss-Prot: P04234.1, SEQ ID NR: 1653) au fost determinate prin rezonanța plasmonilor de suprafață la 37°C utilizând un format de captare a antigenului (Tabelul 7). Măsurătorile au fost efectuate pe un instrument Sierra Sensors MASS-1.

În formatul de captare a antigenului, suprafața senzorului de amină de înaltă densitate MASS-1 a fost derivatizată cu un anticorp policlonal de capră anti-șoarece IgG2a (Southern Biotech). Proteina CD3 heterodimerică solubilă a fost capturată și anticorpii respectivi au fost injectați peste antigenul capturat.

Constantele vitezei de asociere cinetică (k_a) și disociere (k_d) au fost determinate prin procesarea și potrivirea datelor la un model de legare 1:1 utilizând software-ul de ajustare a curbei MASS-1 AnalyserR2. Constantele de echilibru de disociere de legare (K_D) și timpii de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) au fost calculate din constantele vitezei cinetice ca: $K_D(M) = k_d/k_a$; și $t_{1/2}(min) = (ln2)/(60*k_d)$.

Tabelul 7: Afinitățile Anticorpilor Bispecfici anti-CD3 față de CD3 Uman Solubil

Identificator Bispecific al Anticorpului	Format de Captare a Antigenului de Legare la 37°C				
	Legare Antigen anti-CD3 Corespunzător HCVR Identifier	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	$K_D(M)$	T_C (min)
BSPSMA/CD3-003	CD3-VH-G	1.32E+05	7.62E-04	5.78E-09	15.2

BSPSMA/CD3-200	CD3-VH-G2	NB	NB	NB	NB
BSPSMA/CD3-300	CD3-VH-G3	NB	NB	NB	NB
BSPSMA/CD3-400	CD3-VH-G4	NB	NB	NB	NB
BSPSMA/CD3-004	CD3-VH-G5	NB	NB	NB	NB
BSPSMA/CD3-800	CD3-VH-G8	5.95E+04	1.15E-03	1.94E-08	10.0
BSPSMA/CD3-900	CD3-VH-G9	4.38E+04	4.95E-03	1.13E-07	2.3
BSPSMA/CD3-1000	CD3-VH-G10	3.44E+04	6.37E-03	1.85E-07	1.8
BSPSMA/CD3-1100	CD3-VH-G11	9.21E+04	1.02E-03	1.11E-08	11.3
BSPSMA/CD3-1200	CD3-VH-G12	3.85E+04	2.47E-03	6.42E-08	4.7
BSPSMA/CD3-1300	CD3-VH-G13	2.03E+04	2.48E-03	1.22E-07	4.7
BSPSMA/CD3-1400	CD3-VH-G14	6.21E+04	3.31E-03	5.33E-08	3.5
BSPSMA/CD3-1500	CD3-VH-G15	7.36E+04	6.11E-03	8.29E-08	1.9
BSPSMA/CD3-1600	CD3-VH-G16	6.43E+04	2.43E-03	3.78E-08	4.7
BSPSMA/CD3-1700	CD3-VH-G17	4.70E+04	3.07E-03	6.52E-08	3.8
BSPSMA/CD3-1800	CD3-VH-G18	NB	NB	NB	NB
BSPSMA/CD3-1900	CD3-VH-G19	4.43E+04	5.09E-03	1.15E-07	2.3
BSPSMA/CD3-005	CD3-VH-G20	1.73E+04	5.77E-03	3.34E-07	2.0
BSPSMA/CD3-2100	CD3-VH-G21	3.02E+04	2.34E-03	7.75E-08	4.9
Control 1	CD3-L2K	3.68E+05	2.66E-03	7.22E-09	4.3

După cum se arată în Tabelul 7, anticorpii bispecfici anti-CD3 x anti-PSMA fie au menținut legarea foarte slabă la CD3 solubil în testul de legare a rezonanței plasmonilor de suprafață, de ex. având o valoare KD mai mare de 11 nM până la 334 nM care este mai slabă decât cea a brațului anti-CD3 bispecific derivat din cadrele liniei germinale, CD3-VH-G, sau nu a prezentat nicio legare detectabilă.

Ca atare, câțiva anticorpi bispecfici au prezentat valori KD mai mari de 50 nM, iar unii au fost mai mari de 100 nM (adică BSPSMA/CD3-900, BSPSMA/CD3-1000, BSPSMA/CD3-1900, BSPSMA/CD3-005) și chiar dincolo de limita de detecție a testului, adică nu a arătat nicio legare detectabilă la CD3 uman solubil (adică

BSPSMA/CD3-200, BSPSMA/CD3-300, BSPSMA/CD3-400, BSPSMA/CD3-004 și BSPSMA/CD3-1800).

Exemplul 7: Activarea Celulelor T și Citotoxicitatea Specifică Tumorii Prezentate de Anticorpii Bispecfici Măsurate *in vitro*

În acest exemplu, uciderea specifică a celulelor țintă care exprimă PSMA în prezența anticorpilor bispecfici anti-PSMA x anti-CD3 a fost monitorizată prin citometrie în flux. După cum sa raportat anterior, anticorpii bispecfici au prezentat o gamă de afinitate pentru proteina CD3 și liniile celulare care exprimă CD3 {adică, legare slabă, moderată și puternică}. Același grup de anticorpi bispecfici a fost testat pentru capacitatea de a induce celulelor T umane naive să redirecționeze uciderea către celulele care exprimă țintă.

Pe scurt, liniile celulare care exprimă PSMA (C4-2, 22Rv1 și TRAMPC2 _PSMA) au fost etichetate cu 1 μ M de colorant de urmărire fluorescent Violet Cell Tracker. După marcare, celulele au fost placate peste noapte la 37°C. Separat, PBMC-urile umane au fost placate în mediu RPMI suplimentat la 1 x 10⁶ celule/mL și incubate peste noapte la 37°C pentru a se îmbogăți în limfocite prin epuizarea macrofagelor aderente, a celulelor dendritice și a unor monocite. A doua zi, celulele țintă au fost co-incubate cu PBMC naive, epuizate de celule aderente (raport 4:1 de celule Țintă/Efector) și o diluție în serie a anticorpilor bispecfici relevanți sau control izotip (interval de concentrație: 66,7 nM până la 0,25 pM) timp de 48 de 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.

Pentru analiza FACS, celulele au fost colorate cu un urmărit de celule roșii îndepărtate mort/vii (Invitrogen). S-au adăugat 5x10⁵ perle de numărare în fiecare godeu imediat înainte de analiza FACS. S-

au colectat 1×10^4 mărgel 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 și CD69 și prin raportarea procentului de celule T activate (CD69+) din totalul celulelor T (CD2+).

După cum arată rezultatele din Tabelul 8, depleția celulelor care exprimă PSMA a fost observată cu anticorpi bispecfici anti-PSMA x anti-CD3. Majoritatea anticorpilor bispecfici testați au activat și direcționat celulele T umane pentru a epuiza celulele țintă cu EC_{50} s în intervalul picomolar. În plus, liza celulelor țintă observată a fost asociată cu o reglare în sus a celulelor CD69 pe celulele T CD2+, cu pM EC_{50} s.

În mod important, rezultatele acestui exemplu demonstrează că mai multe bispecifice care au utilizat un braț de legare CD3 care a afișat o legare slabă până la neobservabilă la proteina CD3 sau la celulele care exprimă CD3 (adică 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 8: Citotoxicitatea și Proprietățile de Activare a Celulelor T ale Anticorpilor Bispecfici PSMAxCD3 Selectate

Identificator Bispecific al Anticorpului	Brațul de Legare Anti-CD3	C4-2 depleția Celulei EC [M]	22RV1 depleția Celulei EC [M]	TrampC2.PSM A depleția Celulei EC ₅₀ [M]	Activare Celula T EC ₅₀ [M]
BSPSMA/ CD3-003	CD3-VH-G	1.03E-11	NT	6.43E-12	1.23E-12
BSPSMA/ CD3-200	CD3-VH-G2	NT	No activity	NT	No activity
BSPSMA/ CD3-300	CD3-VH-G3	NT	Very weak	NT	1.85E-11
BSPSMA/ CD3-400	CD3-VH-G4	NT	Very weak	NT	Very weak
BSPSMA/ CD3-004	CD3-VH-G5	2.15E-11	6.31E-12	1.15E-11	1.34E-11
BSPSMA/ CD3-800	CD3-VH-G8	NT	NT	9.27E-12	1.76E-12
BSPSMA/ CD3-900	CD3-VH-G9	NT	NT	3.50E-12	1.12E-12
BSPSMA/ CD3-1000	CD3-VH-G10	NT	NT	5.97E-12	1.28E-12
BSPSMA/ CD3-1100	CD3-VH-G11	NT	NT	3.86E-12	1.11E-12
BSPSMA/ CD3-1300	CD3-VH-G13	8.74E-12	NT	NT	2.31E-12
BSPSMA/ CD3-1700	CD3-VH-G17	7.37E-12	2.07E-12	NT	3.89E-12
BSPSMA/ CD3-005	CD3-VH-G20	1.39E-11	8.32E-12	NT	6.11E-12
NT= non testat					

Exemplul 8: Anticorpii bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 Prezintă o Eficacitate Anti-tumorală Puternică *in vivo*

Pentru a determina eficacitatea *in vivo* a anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 exemplificatori, au fost efectuate studii pe șoareci imunocompromiși purtători de xenogrefe de cancer de prostată uman. Au fost efectuate și studii suplimentare în șoareci imunocompetenți purtători de xenogrefe de cancer de prostată de șoarece concepute pentru a exprima PSMA uman.

Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 în Modele de xenogrefă tumorală umană

Pentru a evalua eficacitatea *in vivo* a bispecificilor anti-PSMA/anti-CD3 în studiile de xenogrefă tumorală umană, șoareci NOD scid gamma (NSG) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) au fost co-implantate cu celule mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) împreună cu celulele tumorale de prostată umană 22Rv1 sau C4-2 care exprimă PSMA în mod endogen.

Pe scurt, celulele 4×10^6 22Rv1 sau 5×10^6 C4-2 (MD Anderson, TX) au fost coimplantate s.c. cu 1×10^6 PBMC umane (ReachBio, LLC, Seattle, WA) într-un amestec 50:50 de matrice matrigel (BD Biosciences) în flancul drept al șoarecilor masculi NSG. În studiul 22Rv1, șoarecii au fost tratați i.p. în zilele 0,3 și 7 cu 1 ug de BSPSMA/CD3-001 sau un control izotip (Fig.1). În studiul C4-2, șoarecii au fost tratați i.p. în zilele 0,4 și 7 după implantarea tumorii cu 0,1 mg/kg BSPSMA/CD3-001, BSPSMA/CD3-003 sau BSPSMA/CD3-005.

Într-un model xenogenic suplimentar, bispecificii anti-PSMA/anti-CD3 au fost testați pe șoareci grefați cu celule stem CD34+ hematopoietice umane. Pe scurt, puii nou-născuți SIRPα BALB/c-Rag2-IL2ry-(BRG) au fost grefați cu celule hepatice fetale hCD34+. 3-6 luni mai târziu, șoarecii SIRPα BRG grefați cu hCD34 au fost apoi implantați cu celule C4-2 (5×10^6 s.c. în matrigel). 8 zile mai târziu, șoarecii au fost tratați cu 10 ug de BSPSMA/CD3-004 sau un anticorp de control izotip, urmat de doze de 2x/săptămână pe tot parcursul studiului.

În toate studiile, dimensiunea tumorii a fost măsurată de 2x/săptămână folosind șublere și volumul tumorii calculat ca $Volum = (lungime \times lățime^2)^2$.

După cum arată rezultatele din Tabelul 9, anticorpii bispecfici testați în modelele xenogenice descrise mai sus au fost toți eficienți la inhibarea creșterii tumorii în comparație cu tratamentul cu controlul izotipului.

Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 în modelul de xenogrefă tumorală umană stabilit

Apoi, a fost evaluată eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 în suprimarea creșterii tumorilor stabilite. Șoarecii NSG au fost injectați mai întâi cu $2,5 \times 10^6$ PBMC umane i.p. pentru a permite grefarea celulelor T umane. Paisprezece zile mai târziu, șoarecii au fost co-implantați cu celule C4-2 și PBMC ca mai sus. 20 ug de BSPSMA/CD3-002 sau un control izotip au fost administrate i.p. 18 zile după implantarea tumorii și a continuat de 2x/săptămână pe durata studiului. S-au administrat PBMC-uri suplimentare i.p. în zilele 20 și 40 după implantarea tumorii.

După cum arată rezultatele din Tabelul 9, BSPSMA/CD3-002 a arătat eficacitate în suprimarea creșterii tumorilor stabilite, scăzând creșterea tumorii cu 95%.

Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 în modelul tumoral imuno-competent

În plus, bispecificii anti-PSMA/anti-CD3 au fost evaluați pentru activitatea anti-tumorală într-un model imuno-competent. Șoarecii umanizați pentru cele trei lanțuri ($\delta\gamma\epsilon$) ale CD3, precum și pentru PSMA au fost implantați cu o variantă de linie celulară de cancer de prostată murin TRAMP-C2 transfectată cu PSMA uman.

Înainte de inițierea studiului, a fost generată varianta de linie celulară tumorigenă TRAMP-C2_hPSMAv#1. Pe scurt, celule $7,5 \times 10^6$ TRAMP-C2_hPSMA au fost implantate s.c. în flancul drept al șoarecilor masculi umanizați pentru CD3 și PSMA. O tumoră a fost excizată și tăiată în fragmente de 3 mm și ulterior implantată în flancul drept al noilor șoareci masculi umanizați. O tumoră care decurge din fragmentele tumorale implantate a fost apoi recoltată și dezagregată într-o singură suspensie celulară. Aceste celule (TRAMP-C2_hPSMAv#1) au fost apoi cultivate *in vitro* sub selecție G418. 4×10^6 celule din această variantă de linie celulară au fost apoi implantate în flancul drept al șoarecilor masculi umanizați PSMA/CD3 pentru studiile de eficacitate a anticorpilor bispecfici.

Șoarecii PSMA/CD3 umanizați implantați cu TRAMP-C2_hPSMAv#1 au fost tratați cu 100 ug sau 10 ug de anticorp bispecific anti-PSMA/anti-CD3 BSPSMA/CD3-001 sau BSPSMA/CD3-004 sau un

control izotip de 2x/săptămână începând din ziua implantării tumorii. Au fost de asemenea examinate nivelurile serice de citokine la 4 ore după injectare, precum și nivelurile celulelor T ale splinei.

Studiul a fost încheiat în ziua 27.

După cum arată rezultatele din Tabelul 10, ambele molecule bispecifice anti-PSMA/anti-CD3 au arătat eficacitate în întârzierea semnificativă a creșterii tumorii în grupurile de tratament. Eliberarea de citokine dependentă de doză a fost observată după tratamentul cu BSPSMA/CD3-001. S-a observat o eliberare minimă de citokine după administrarea BSPSMA/CD3-004, posibil datorită legării slabe a anti-CD3.

BSPSMA/CD3-001 a arătat eficacitate anti-tumorală fără epuizarea celulelor T în splină.

Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 asupra tumorilor stabilite în modelul imunitar competent

În cele din urmă, a fost evaluată eficacitatea moleculelor bispecifice anti-PSMA/anti-CD3 selectate asupra reducerii creșterii tumorilor stabilite la șoarecii PSMA/CD3 umanizați. Celulele TRAMP-C2_hPSMAv#1 au fost transplantate la șoareci umanizați așa cum s-a descris mai sus și s-au administrat 100 μg BSPSMA/CD3-001 sau control izotip i.p. 2x/săptămână la 14 zile după implantarea tumorii, când dimensiunile tumorii variau între 50 mm³-100 mm³. După cum arată rezultatele din Tabelul 11, BSPSMA/CD3-001 a fost eficient în acest model de tumoră stabilit, prezentând o scădere cu 84% a creșterii tumorii comparativ cu grupul martor.

În rezumat, anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 ai acestei invenții prezintă o eficacitate anti-tumorală puternică atât în modelele de tumori imunocompromise cât și imuno-competente. În plus, câțiva dintre anticorpilor bispecfici testați (BSPSMA/CD3-001 și 002) au prezentat o capacitate puternică de a reduce volumul tumorilor stabilite.

De remarcă, în absența celulelor tumorale care exprimă PSMA, nu a fost observată nicio activare a celulelor T.

În plus, la șoarecii fără tumori, au fost colectate probe de sânge la 4 ore după tratamentul cu anticorpi bispecific PSMAxCD3 și s-au determinat nivelurile serice de citokine. Au fost determinate creșteri tranzitorii ale nivelurilor de citokine, și anume interferon-gamma (IFN-γ), factor de necroză tumorală (TNF), interleukină-2 (IL-2) și interleukină-6 (IL-6), iar creșterile tranzitorii au fost dependente de doză (Fig. 2A-2D).

Pentru a valida specificitatea anticorpilor bispecfici, șoarecii fie umanizați atât pentru PSMA, cât și pentru CD3 sau șoarecii umanizați numai pentru CD3 au fost dozați cu 100μg de PSMAxCD3 și examinați pentru citokine serice (4 ore după doză) și pierderea tranzitorie de celule T din sânge (24 de ore după doză). Tratamentul cu anticorpi bispecific PSMAxCD3 la un șoarece cu celule T umanizate (100 μg/șoarece) induce creșterea acută a citokinelor (de ex. IFNγ), precum și scăderea tranzitorie a celulelor T circulante (Fig. 3A-3B). Această descoperire reproduce modificări ale citokinelor și celulelor T care au fost observate la pacienții umani tratați cu anticorpi bispecfici antigen tumoral x CD3.

Anticorpilor bispecfici PSMAxCD3 sunt eficienți fără a epuiza celulele T efectoare din splina șoarecilor imunocompetenți, așa cum se arată în Fig. 4A-4C. Pe scurt, șoarecii umanizați PSMA și CD3 Velocigene® au fost implantați cu tumori care exprimă hPSMA și tratați cu PSMAxCD3 de două ori pe săptămână. Celulele T au fost prezente în număr normal la recoltarea finală. Splinele au fost examinate pentru celule T CD4+, celule T CD8+ și Treg la sfârșitul experimentului după tratamentul cu anticorpi bispecific PSMAxCD3 de două ori pe săptămână pe parcursul studiului. Șoarecii umanizați pentru PSMA și CD3 au fost implantați cu tumori TRAMP-C2_hPSMA și dozați din ziua 0 cu 100μg sau 10μg de PSMAxCD3. Populațiile de celule din splină au fost analizate prin citometrie în flux. Datele au fost analizate folosind analiza varianței (ANOVA) pentru orice efecte semnificative în comparație cu grupul de control cu izotip, dar nu au fost găsite diferențe semnificative (Fig. 4A-4C).

Tabelul 9: Eficacitatea Anticorpilor Bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 la Modelele de Xenogrefă Imuno-Compromise

Model Xenogenic: oprirea creșterii tumorii				
Model Tumoră specie șoarece	N # șoarece/ grup de tratament	Identificator Anticorp Bispecific	Doza	Volum Tumoră Finală (mm ³) Mediu 6 SD

22Rv1/ NSG	5	BSPSMA/CD3-001	1.0 ug/șoarece pe zi 0,3 & 7	370 6 270
	5	Isotype Control		1260 6 730
C4-/2 NSG	5	BSPSMA/CD3-001	0.1 mg/kg pe zi 0,4 & 7	060
	5	BSPSMA/CD3-003		060
	5	BSPSMA/CD3-005		060
	5	Isotype Control		960 6 660
C4-2/ SIRPa Balb/c- Rag2-IL2ry- BRG grefat cu hCD34+ HSC	5	BSPSMA/CD3-004	1.0 ug/șoarece 23/săptămână	70 6 60
	5	Izotip Control		260 6 180

Model Xenogenic: oprirea creșterii tumorii				
Model Tumoră / specie șoarece	N # șoarece/ grup de tratament	Identificator de Anticorp Bispecific Doza: 20 ug/ șoarece	Creștere Tumoră (mm ³) de la început tratament (mediu±SD)	% Scădere Tumoră Creștere vs. Control
C4-2/ NSG	5	BSPSMA/CD3-002	60±100	95%
	4	Isotip Control	1170± 600	(-)

					Concentrații Medii Citokine în Ser. (pg/mL)					Nivel celuleT splină %, (medie±SD)#	
Model Tumoră Specie Șoarece	Identificator Anticorp Bispecific	Doza (ug/ șoarece) 23/ săptămână*	N # șoarece/ grup tratament	Volum Tumoră (mm ³) la Ziua 27 (Medie ± SD)	IFNg	TNFα	IL-2	IL-12p70	IL-6	CD4+	CD8+
TRAMP-C2/ PSMA ^{Hum} /hum CD3 ^{Hum} /Hum	BSPSMA/CD3-001	100	4	260 ± 250	130	180	150	70	20	6.0 ±1.0	13.0 ±3.0
		10	6	600 ± 330	80	140	140	30	1130	7.0 ±2.0	14.0±3.0
	BSPSMA/CD3-004	100	4	50 ± 60	30	60	60	40	370	8.0 ±1.0	12.0±2.0
		10	5	380 ± 650	10	50	50	10	330	8.0±3.0	14.0±4.0
	Isotype Control	100	5	1740 ± 560	4	30	30	10	230	5.0 ±1.0	8.0±2.0

*Șoarecii au fost dozați cu anticorpi sau izotip de control de 2x/săptămână începând din ziua implantării tumorii
Măsurat ca procent de celule CD4+ sau CD8+ din splină din celulele mCD45+ vii

Tabelul 11: Eficacitatea anticorpilor bispecfici anti-PSMA/anti-CD3 în suprimarea creșterii tumorale stabilite în modelul singeneic competent imun

Eficacitatea tumorii în modelul imuno-competent, tumori stabile			
Model Tumoră / Specie de șoarece	Identificator Anticorp Bispecific Doza: 100 ug/șoarece	Creștere tumoră (mm ³) de la începutul tratamentului (media±SD)	% Scăderea tumorii Creștere vs. Control
TRAMP-C2/ PSMA	BSPSMA/CD3-001	170 ± 170	84
Hum/hum Hum/Hum	Izotip Control	740 ± 570	(-)

5 Exemplul 9: 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 himerici 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 exemplificatori generați în conformitate cu metodele din acest exemplu sunt descrise în detaliu în exemplele de aici.

20 Exemplul 10: Aminoacid de Regiune Variabilă cu Lanț Greu și Ușor și Secvențe de Acid Nucleic

Tabelul 12 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor și CDR-urile anticorpilor anti-CD3 selectați.

25 Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 13. Metodele de producere a anticorpilor anti-CD3 dezvăluiți aici pot fi găsite de asemenea în publicația SUA 2014/0088295.

Tabelul 12: Identificatori de Secvență de Aminoacizi

	SEQ ID NR:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	154	156	158	160	162	164	166	168
H1M2692N	170	172	174	176	178	180	182	184
H1M3542N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1M3544N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M3549N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M3613N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M2689N	250	252	254	256	258	260	262	264
H2M2690N	266	268	270	272	274	276	278	280
H2M2691N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M2704N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M2705N	314	316	318	320	322	324	326	328

MD/EP 3328888 T2 2023.04.30

52

H2M2706N	330	332	334	336	338	340	342	344
H2M2707N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M2708N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M2709N	378	380	382	384	386	388	390	392

(continuate) 1

	SEQ ID NR:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H2M2710N	394	396	398	400	402	404	406	408
H2M2711N	410	412	414	416	418	420	422	424
H2M2774N	426	428	430	432	434	436	438	440
H2M2775N	442	444	446	448	450	452	454	456
H2M2776N	458	460	462	464	466	468	470	472
H2M2777N	474	476	478	480	482	484	486	488
H2M2778N	490	492	494	496	498	500	502	504
H2M2779N	506	508	510	512	514	516	518	520
H2M2789N	522	524	526	528	530	532	534	536
H2M2862N	538	540	542	544	546	548	550	552
H2M2885N	554	556	558	560	562	564	566	568
H2M2886N	570	572	574	576	578	580	582	584
H2M3540N	586	588	590	592	594	596	598	600
H2M3541N	602	604	606	608	610	612	614	616
H2M3543N	618	620	622	624	626	628	630	632
H2M3547N	634	636	638	640	642	644	646	648
H2M3548N	650	652	654	656	658	660	662	664
H2M3563N	666	668	670	672	674	676	678	680
H1H5751P	682	684	686	688	690	692	694	696
H1H5752P	698	700	702	704	706	708	710	712
H1H5753B	714	716	718	720	722	724	726	728
H1H5754B	730	732	734	736	738	740	742	744
H1H5755B	746	748	750	752	754	756	758	760
H1H5756B	762	764	766	768	770	772	774	776
H1H5757B	778	780	782	784	786	788	790	792
H1H5758B	794	796	798	800	802	804	806	808
H1H5761P	810	812	814	816	818	820	822	824
H1H5763P	826	828	830	832	834	836	838	840
H1H5764P	842	844	846	848	850	852	854	856
H1H5769P	858	860	862	864	866	868	870	872
H1H5771P	874	876	878	880	882	884	886	888
H1H5772P	890	892	894	896	898	900	902	904

MD/EP 3328888 T2 2023.04.30

53

H1H5777P	906	908	910	912	914	916	918	920
H1H5778P	922	924	926	928	930	932	934	936
H1H5780P	938	940	942	944	946	948	950	952
H1H5781P	954	956	958	960	962	964	966	968
H1H5782P	970	972	974	976	978	980	982	984

(continua) 2

	SEQ ID NR:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H5785B	986	988	990	992	994	996	998	1000
H1H5786B	1002	1004	1006	1008	1010	1012	1014	1016
H1H5788P	1018	1020	1022	1024	1026	1028	1030	1032
H1H5790B	1034	1036	1038	1040	1042	1044	1046	1048
H1H5791B	1050	1052	1054	1056	1058	1060	1062	1064
H1H5792B	1066	1068	1070	1072	1074	1076	1078	1080
H1H5793B	1082	1084	1086	1088	1090	1092	1094	1096
H1H5795B	1098	1100	1102	1104	1106	1108	1110	1112
H1H5796B	1114	1116	1118	1120	1122	1124	1126	1128
H1H5797B	1130	1132	1134	1136	1138	1140	1142	1144
H1H5798B	1146	1148	1150	1152	1154	1156	1158	1160
H1H5799P	1162	1164	1166	1168	1170	1172	1174	1176
H1H5801B	1178	1180	1182	1184	1186	1188	1190	1192
H1H7194B	1194	1196	1198	1200	1386	1388	1390	1392
H1H7195B	1202	1204	1206	1208	1386	1388	1390	1392
H1H7196B	1210	1212	1214	1216	1386	1388	1390	1392
H1H7198B	1218	1220	1222	1224	1386	1388	1390	1392
H1H7203B	1226	1228	1230	1232	1386	1388	1390	1392
H1H7204B	1234	1236	1238	1240	1386	1388	1390	1392
H1H7208B	1242	1244	1246	1248	1386	1388	1390	1392
H1H7211B	1250	1252	1254	1256	1386	1388	1390	1392
H1H7221B	1258	1260	1262	1264	1386	1388	1390	1392
H1H7223B	1266	1268	1270	1272	1386	1388	1390	1392
H1H7226B	1274	1276	1278	1280	1386	1388	1390	1392
H1H7232B	1282	1284	1286	1288	1386	1388	1390	1392
H1H7233B	1290	1292	1294	1296	1386	1388	1390	1392
H1H7241B	1298	1300	1302	1304	1386	1388	1390	1392
H1H7242B	1306	1308	1310	1312	1386	1388	1390	1392
H1H7250B	1314	1316	1318	1320	1386	1388	1390	1392
H1H7251B	1322	1324	1326	1328	1386	1388	1390	1392
H1H7254B	1330	1332	1334	1336	1386	1388	1390	1392

H1H7258B	1338	1340	1342	1344	1386	1388	1390	1392
H1H7269B	1346	1348	1350	1352	1386	1388	1390	1392
H1H7279B	1354	1356	1358	1360	1386	1388	1390	1392
H1xH7221G	1362	1364	1366	1368	1386	1388	1390	1392
H1xH7221G3	1370	1372	1374	1376	1386	1388	1390	1392
H1xH7221G5	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392

Tabelul 13: Identificatori de secvență de acid nucleic

	SEQ ID NR:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	153	155	157	159	161	163	165	167
H1M2692N	169	171	173	175	177	179	181	183
H1M3542N	185	187	189	191	193	195	197	199
H1M3544N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M3549N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M3613N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M2689N	249	251	253	255	257	259	261	263
H2M2690N	265	267	269	271	273	275	277	279
H2M2691N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M2704N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M2705N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M2706N	329	331	333	335	337	339	341	343
H2M2707N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M2708N	361	363	365	367	369	371	373	375
H2M2709N	377	379	381	383	385	387	389	391
H2M2710N	393	395	397	399	401	403	405	407
H2M2711N	409	411	413	415	417	419	421	423
H2M2774N	425	427	429	431	433	435	437	439
H2M2775N	441	443	445	447	449	451	453	455
H2M2776N	457	459	461	463	465	467	469	471
H2M2777N	473	475	477	479	481	483	485	487
H2M2778N	489	491	493	495	497	499	501	503
H2M2779N	505	507	509	511	513	515	517	519
H2M2789N	521	523	525	527	529	531	533	535
H2M2862N	537	539	541	543	545	547	549	551
H2M2885N	553	555	557	559	561	563	565	567
H2M2886N	569	571	573	575	577	579	581	583
H2M3540N	585	587	589	591	593	595	597	599
H2M3541N	601	603	605	607	609	611	613	615
H2M3543N	617	619	621	623	625	627	629	631

MD/EP 3328888 T2 2023.04.30

55

H2M3547N	633	635	637	639	641	643	645	647
H2M3548N	649	651	653	655	657	659	661	663
H2M3563N	665	667	669	671	673	675	677	679
H1H5751P	681	683	685	687	689	691	693	695
H1H5752P	697	699	701	703	705	707	709	711
H1H5753B	713	715	717	719	721	723	725	727

(continuate) 1

	SEQ ID NOs:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H5754B	729	731	733	735	737	739	741	743
H1H5755B	745	747	749	751	753	755	757	759
H1H5756B	761	763	765	767	769	771	773	775
H1H5757B	777	779	781	783	785	787	789	791
H1H5758B	793	795	797	799	801	803	805	807
H1H5761P	809	811	813	815	817	819	821	823
H1H5763P	825	827	829	831	833	835	837	839
H1H5764P	841	843	845	847	849	851	853	855
H1H5769P	857	859	861	863	865	867	869	871
H1H5771P	873	875	877	879	881	883	885	887
H1H5772P	889	891	893	895	897	899	901	903
H1H5777P	905	907	909	911	913	915	917	919
H1H5778P	921	923	925	927	929	931	933	935
H1H5780P	937	939	941	943	945	947	949	951
H1H5781P	953	955	957	959	961	963	965	967
H1H5782P	969	971	973	975	977	979	981	983
H1H5785B	985	987	989	991	993	995	997	999
H1H5786B	1001	1003	1005	1007	1009	1011	1013	1015
H1H5788P	1017	1019	1021	1023	1025	1027	1029	1031
H1H5790B	1033	1035	1037	1039	1041	1043	1045	1047
H1H5791B	1049	1051	1053	1055	1057	1059	1061	1063
H1H5792B	1065	1067	1069	1071	1073	1075	1077	1079
H1H5793B	1081	1083	1085	1087	1089	1091	1093	1095
H1H5795B	1097	1099	1101	1103	1105	1107	1109	1111
H1H5796B	1113	1115	1117	1119	1121	1123	1125	1127
H1H5797B	1129	1131	1133	1135	1137	1139	1141	1143
H1H5798B	1145	1147	1149	1151	1153	1155	1157	1159
H1H5799P	1161	1163	1165	1167	1169	1171	1173	1175
H1H5801B	1177	1179	1181	1183	1185	1187	1189	1191
H1H7194B	1193	1195	1197	1199	1385	1387	1389	1391

H1H7195B	1201	1203	1205	1207	1385	1387	1389	1391
H1H7196B	1209	1211	1213	1215	1385	1387	1389	1391
H1H7198B	1217	1219	1221	1223	1385	1387	1389	1391
H1H7203B	1225	1227	1229	1231	1385	1387	1389	1391
H1H7204B	1233	1235	1237	1239	1385	1387	1389	1391
H1H7208B	1241	1243	1245	1247	1385	1387	1389	1391
H1H7211B	1249	1251	1253	1255	1385	1387	1389	1391

(continuare) 2

	SEQ ID NOs:							
Denumire Anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H7221B	1257	1259	1261	1263	1385	1387	1389	1391
H1H7223B	1265	1267	1269	1271	1385	1387	1389	1391
H1H7226B	1273	1275	1277	1279	1385	1387	1389	1391
H1H7232B	1281	1283	1285	1287	1385	1387	1389	1391
H1H7233B	1289	1291	1293	1295	1385	1387	1389	1391
H1H7241B	1297	1299	1301	1303	1385	1387	1389	1391
H1H7242B	1305	1307	1309	1311	1385	1387	1389	1391
H1H7250B	1313	1315	1317	1319	1385	1387	1389	1391
H1H7251B	1321	1323	1325	1327	1385	1387	1389	1391
H1H7254B	1329	1331	1333	1335	1385	1387	1389	1391
H1H7258B	1337	1339	1341	1343	1385	1387	1389	1391
H1H7269B	1345	1347	1349	1351	1385	1387	1389	1391
H1H7279B	1353	1355	1357	1359	1385	1387	1389	1391
H1xH7221G	1361	1363	1365	1367	1385	1387	1389	1391
H1xH7221G3	1369	1371	1373	1375	1385	1387	1389	1391
H1xH7221G5	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391

- La anticorpi se face referire în mod obișnuit aici conform următoarei nomenclaturi: prefixul Fc (de ex. 'H1H', 'H1M', 'H2M' etc.), urmat de un identificator numeric (de exemplu, '2712', '2692' etc.), după cum se arată în Tabelul 1), urmat de un Sufix 'P', 'N' sau '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 IgG1 Fc uman, un anticorp 'H1M' are un IgG1 Fc de șoarece și un anticorp 'H2M' are un IgG2 Fc de șoarece (toate regiunile variabile sunt complet umane, așa cum este indicat de primul 'H' în denumirea anticorpului). După cum va fi apreciat de o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, un anticorp având un izotip Fc particular 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 14 și 15 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi pentru regiunile variabile ale lanțului greu (Tabelul 14) și regiunile variabile ale lanțului ușor (Tabelul 15) și CDR-urile corespunzătoare acestora, ale HCVR și LCVR-uri suplimentare anti-CD3 utile în anti-PSMA x anti-CD3 anticorpi bispecifici.

Tabelul 14 (Secvențe de aminoacizi din regiunea variabilă a lanțului greu)

	SEQ ID NR			
Identificator al Lanțului Greu	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1394	1396	1398	1400
CD3-VH-B	1410	1412	1414	1416
CD3-VH-C	1426	1428	1430	1432
CD3-VH-D	1442	1444	1446	1448
CD3-VH-E	1458	1460	1462	1464
CD3-VH-F#	1473	1474	1475	1476

5 Tabelul 15 (Secvențe de aminoacizi din regiunea variabilă a lanțului ușor)

	SEQ ID NOs			
Identificator al Lanțului Ușor	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1402	1404	1406	1408
CD3-VL-B	1418	1420	1422	1424
CD3-VL-C	1434	1436	1438	1440
CD3-VL-D	1450	1452	1454	1456
CD3-VL-E	1466	1468	1470	1472
CD3-VL-F#	1477	1478	1479	1480

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

- 10 În plus, Tabelele 16 și 17 stabilesc identificatorii de secvență pentru secvențele de nucleotide care codifică regiunile variabile ale lanțului greu (Tabelul 16) și regiunile variabile ale lanțului ușor (Tabelul 17) și CDR-urile corespunzătoare ale HCVR și LCVR-uri suplimentare anti-CD3 utile, în anticorpii bispecfici anti-PSMA x anti-CD3.

15 Tabelul 16 (Secvențe de nucleotide care codifică secvențe de regiune variabilă a lanțului greu)

	SEQ ID NR			
Identificator al Lanțului Greu	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1393	1395	1397	1399
CD3-VH-B	1409	1411	1413	1415
CD3-VH-C	1425	1427	1429	1431
CD3-VH-D	1441	1443	1445	1447
CD3-VH-E	1457	1459	1461	1463

Tabelul 17 (Secvențe de nucleotide care codifică secvențe de regiune variabilă a lanțului ușor)

	SEQ ID NR			
Identificator al Lanțului Ușor	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1401	1403	1405	1407

CD3-VL-B	1417	1419	1421	1423
CD3-VL-C	1433	1435	1437	1439
CD3-VL-D	1449	1451	1453	1455
CD3-VL-E	1465	1467	1469	1471

Constructele de control utilizate în următoarele exemple

Diverse constructe de control (anticorpi anti-CD3) au fost incluse în experimentele ce urmează 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 Biolegend, 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 11: 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 18-21 au aceeași secvență de lanț ușor de VK1 - 39JK5 (LCVR prezentat în SEQ ID NR: 1386).

Anticorpii generați au fost testați pentru afinitatea față de 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 NR: 1634) a fost identificat, printre alții, care s-a descoperit că se leagă atât la CD3 uman, cât și la cynomolgus având o afinitate EC_{50} între 1 și 40 nM, așa cum s-a determinat într-o titrare FACS a celulelor Jurkat și, respectiv, a celulelor T cynomolgus. Vezi, de ex. Experimentele de legare FACS prezentate în Exemplul 5.

Resturile de aminoacizi ale liniei germinale ale CD3-VH-P au fost ulterior identificate și un anticorp denumit „CD3-VH-G” a fost proiectat pentru a conține doar cadre de linie germinală. 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 afinitatea de legare așa cum s-a observat în testele FACS, câțiva anticorpi anti-CD3 s-au legat la CD3 uman sau cyno *in vitro* cu afinitate de legare slabă până la deloc măsurabilă, cum ar fi EC_{50} 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 exemplificați anti-CD3 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 18 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și CDR-urile anticorpilor anti-CD3 selectați.

Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 19.

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 NR: 1662) i s-a atribuit o desemnare a numărului „G” pentru o nomenclatură consistentă. Tabelul 2 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 19. Identificatorii secvenței de aminoacizi și acid nucleic ai regiunii variabile ale lanțului ușor și CDR-urile sunt de asemenea identificați mai jos în Tabelele 20 și, respectiv, 21.

Tabelul 18: Identificatori de secvență de aminoacizi cu lanț greu

Denumire Anticorp CD3-VH	SEQ ID NR:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1482	1484	1486	1488
CD3-VH-G2	1490	1492	1494	1496
CD3-VH-G3	1498	1500	1502	1504
CD3-VH-G4	1506	1508	1510	1512
CD3-VH-G5	1514	1516	1518	1520
CD3-VH-G8	1522	1524	1526	1528
CD3-VH-G9	1530	1532	1534	1536
CD3-VH-G10	1538	1540	1542	1544
CD3-VH-G11	1546	1548	1550	1552
CD3-VH-G12	1554	1556	1558	1560
CD3-VH-G13	1562	1564	1566	1568
CD3-VH-G14	1570	1572	1574	1576
CD3-VH-G15	1578	1580	1582	1584

continuare

Denumire Anticorp CD3-VH	SEQ ID NR:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G16	1586	1588	1590	1592
CD3-VH-G17	1594	1596	1598	1600
CD3-VH-G18	1602	1604	1606	1608
CD3-VH-G19	1610	1612	1614	1616
CD3-VH-G20	1618	1620	1622	1624
CD3-VH-G21	1626	1628	1630	1632
CD3-VH-P	1634	1636	1638	1640

5 Tabelul 19: Identificatori de secvență de acid nucleic cu lanț greu

Denumire Anticorp CD3-VH	SEQ ID NR:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1481	1483	1485	1487
CD3-VH-G2	1489	1491	1493	1495
CD3-VH-G3	1497	1499	1501	1503
CD3-VH-G4	1505	1507	1509	1511
CD3-VH-G5	1513	1515	1517	1519
CD3-VH-G8	1521	1523	1525	1527
CD3-VH-G9	1529	1531	1533	1535
CD3-VH-G10	1537	1539	1541	1543
CD3-VH-G11	1545	1547	1549	1551
CD3-VH-G12	1553	1555	1557	1559

CD3-VH-G13	1561	1563	1565	1567
CD3-VH-G14	1569	1571	1573	1575
CD3-VH-G15	1577	1579	1581	1583
CD3-VH-G16	1585	1587	1589	1591
CD3-VH-G17	1593	1595	1597	1599
CD3-VH-G18	1601	1603	1605	1607
CD3-VH-G19	1609	1611	1613	1615
CD3-VH-G20	1617	1619	1621	1623
CD3-VH-G21	1625	1627	1629	1631
CD3-VH-P	1633	1635	1637	1639

Tabel 20: Identificatori de secvență de aminoacizi a lanțului ușor

Denumire Anticorp	SEQ ID NR:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1386	1644	1646	1648

Tabelul 21: Identificatori de secvență de acid nucleic al lanțului ușor

Denumire Anticorp	SEQ ID NR:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1641	1643	1645	1647

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

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 FeID1.

Exemplul 13: Afinitățile de Legare Derivate prin Rezonanța Plasmonului de Suprafață și Constantele Cinetice ale Anticorpilor Monoclonali Umani Anti-CD3

Afinitățile de legare și constantele cinetice ale anticorpilor monoclonali umani anti-CD3 au fost determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C

folosind fie un format de captare a anticorpilor (Tabelele 22, 24 și 26), fie un format de captare a antigenului (Tabelele 23, 25, și 27). Măsurătorile au fost efectuate pe un instrument T200 Biacore.

În formatul de captare de anticorpi, suprafața senzorului Biacore a fost derivatizată cu un Fc anti-șoarece de iepure pentru capturarea hibridomului (prefixul anticorpului H1M sau H2M) sau o suprafață Fc anti-uman de șoarece pentru anticorpi formați IgG umani (prefixul anticorpului H1H). Proteina CD3 heterodimerică solubilă (hCD3-epsilon/hCD3-delta; SEQ ID NR:1652/1653) fie cu o etichetă Fc umană (hFcΔAdp/hFc; SEQ ID NR:1683/1684) sau o etichetă Fc de șoarece (mFcΔAdp/mFc; SEQ ID NR:1685/1686) a fost injectat pe suprafața capturată cu anticorpi și a fost înregistrat răspunsul de legare. Proteina CD3 heterodimerică a fost purificată folosind metoda descrisă în Davis și colab. (US2010/0331527).

În formatul de captare a antigenului, proteina CD3 heterodimerică a fost capturată folosind un Fc anti-șoarece de iepure sau Fc anti-uman de șoarece și anticorpii respectivi au fost injectați peste antigenul capturat.

Anticorpii au fost analizați în formatul lor convențional divalent (Tabelele 22-25) sau într-o configurație monovalentă cu 1 braț (Tabelele 26-27) în care al doilea Fab din anticorp a fost îndepărtat și doar porțiunea Fc (CH2-CH3) a fost exprimată.

Constantele vitezei de asociere cinetică (k_a) și disociere (k_d) au fost determinate prin procesarea și potrivirea datelor la un model de legare 1:1 utilizând software-ul de ajustare a curbei Scrubber 2.0.

Constantele de echilibru de disociere de legare (K_D) și timpii de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) au fost calculate din constantele vitezei cinetice ca: $K_D(M) = k_d/k_a$; și $t_{1/2}(\text{min}) = (\ln 2)/(60 \cdot k_d)$. NT= netestat; NB = nicio legătură observată.

5

Tabelul 22: Afinitățile de legare Biacore ale mAbs de hibridom (H1M și H2M)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Antibody	k_a (Ms^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (Molar)	T° (min)
H2M2689N	7.73E+05	3.23E-03	4.18E-09	4
H2M2690N	9.70E+03	2.02E-04	2.09E-08	57
H2M2691N	1.03E+04	2.07E-04	2.01E-08	56
H1M2692N	8.05E+03	4.34E-04	5.39E-08	27
H2M2704N	3.46E+04	6.92E-04	2.00E-08	17
H2M2705N	6.62E+04	9.10E-04	1.37E-08	13
H2M2706N	3.29E+04	4.44E-03	1.35E-07	3
H2M2707N	2.95E+04	1.87E-03	6.35E-08	6
H2M2708N	6.94E+04	6.12E-04	8.82E-09	19
H2M2709N	NT	NT	NT	NT
H2M2710N	6.72E+04	7.53E-04	1.12E-08	15
H2M2711N	6.72E+04	7.67E-04	1.14E-08	15
H1M2712N	9.32E+03	2.19E-04	2.35E-08	53

continuare (22)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (Molar)	T° (min)
H2M2774N	7.79E+04	9.18E-04	1.18E-08	13
H2M2775N	6.97E+04	6.26E-04	8.98E-09	18
H2M2776N	6.29E+04	6.39E-04	1.02E-08	18
H2M2777N	3.70E+04	1.63E-03	4.39E-08	7
H2M2778N	2.13E+04	1.89E-04	8.90E-09	61
H2M2779N	2.18E+04	2.28E-04	1.05E-08	51
H2M2789N	NT	NT	NT	NT
H2M2862N	3.72E+04	3.00E-03	8.07E-08	4
H2M2885N	6.82E+04	6.51E-04	9.54E-09	18
H2M2886N	7.29E+04	6.53E-04	8.96E-09	18
H2M3540N	3.77E+04	6.11E-04	1.62E-08	19
H2M3541N	7.10E+03	1.35E-03	1.89E-07	9
H1M3542N	2.37E+04	5.08E-04	2.14E-08	23
H2M3543N	7.53E+03	2.26E-04	3.00E-08	51
H 1 M3544N	9.69E+03	1.42E-04	1.46E-08	82
H2M3547N	2.18E+04	3.47E-04	1.59E-08	33
H2M3548N	3.87E+04	5.04E-03	1.30E-07	2
H1M3549N	1.18E+04	9.19E-04	7.76E-08	13

H2M3563N	3.24E+04	1.19E-04	3.66E-09	97
H1M3613N	1.93E+04	3.04E-04	1.57E-08	38

Tabelul 23: Afinitățile de Legare Biacore ale mAbs de hibridom (H1M și H2M)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	ka (Ms⁻¹)	kd (s⁻¹)	K_D (Molar)	T_° (min)
H2M2689N	1.71 E+06	9.97E-05	5.83E-11	116
H2M2690N	7.51E+04	6.35E-06	7.99E-11	1820
H2M2691N	3.94E+04	9.98E-06	2.54E-10	1158
H1M2692N	4.19E+04	9.90E-06	2.38E-10	1167
H2M2704N	1.32E+06	2.48E-04	1.87E-10	47
H2M2705N	2.43E+06	3.41E-04	1.40E-10	34
H2M2706N	5.63E+05	3.06E-04	5.44E-10	38
H2M2707N	3.99E+05	2.85E-04	7.15E-10	41
H2M2708N	1.73E+06	2.27E-04	1.31E-10	51
H2M2709N	NT	NT	NT	NT
H2M2710N	1.59E+06	2.43E-04	1.53E-10	48
H2M2711N	1.59E+06	2.40E-04	1.51E-10	48

Continuare (23)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	ka (Ms⁻¹)	kd (s⁻¹)	K_D (Molar)	T_° (min)
H1M2712N	4.75E+04	1.37E-05	2.95E-10	846
H2M2774N	2.49E+06	3.36E-04	1.35E-10	34
H2M2775N	1.56E+06	2.16E-04	1.38E-10	53
H2M2776N	1.58E+06	2.22E-04	1.40E-10	52
H2M2777N	5.80E+05	3.21E-04	5.54E-10	36
H2M2778N	1.50E+05	6.57E-06	4.68E-11	1758
H2M2779N	1.28E+05	1.23E-05	9.38E-11	941
H2M2789N	NT	NT	NT	NT
H2M2862N	5.91E+05	3.21E-04	5.41E-10	36
H2M2885N	1.37E+06	1.52E-04	1.11E-10	76
H2M2886N	1.42E+06	1.36E-04	9.56E-11	85
H2M3540N	2.55E+06	5.87E-04	2.31E-10	20
H2M3541N	8.40E+04	1.16E-03	1.38E-08	10
H1M3542N	4.37E+05	2.00E-04	4.57E-10	58
H2M3543N	1.22E+05	7.96E-05	6.53E-10	145
H1M3544N	5.74E+04	5.98E-05	1.04E-09	193
H2M3547N	4.70E-05	1.00E-05	2.15E-11	1155
H2M3548N	NT	NT	NT	NT
H1M3549N	2.81E+05	2.89E-04	1.03E-09	40

H2M3563N	6.16E+05	4.77E-05	7.73E-11	242
H1M3613N	2.20E+05	9.60E-05	4.35E-10	120

Tabelul 24: Afinitățile de Legare Biacore ale mAb-urilor Fc umane (H1H)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T_C (min)
H1H2690N	NT	NT	NT	NT
H1H2712N	3.06E+03	2.70E-04	8.82E-08	43
H1H5751P	4.01E+03	5.18E-04	1.29E-07	22
H1H5752P	NB	NB	NB	NB
H1H5753B	NT	NT	NT	NT
H1H5755B	8.21E+03	4.72E-04	5.75E-08	24
H1H5756B	8.15E+03	2.66E-04	3.26E-08	43
H1H5757B	6.63E+03	7.85E-04	1.18E-07	15
H1H5758B	5.02E+03	1.17E-03	2.33E-07	10
H1H5761P	4.72E+03	2.44E-02	5.16E-06	0
H1H5763P	1.85E+04	5.40E-02	2.92E-06	0

continuare (24)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T_C (min)
H1H5764P	4.16E+03	1.59E-02	3.82E-06	1
H1H5769P	7.80E+03	9.41E-04	1.21E-07	12
H1H5771P	3.00E+04	6.26E-04	2.09E-08	18
H1H5772S	1.56E+04	1.55E-03	9.96E-08	7
H1H5777P	1.35E+04	3.02E-03	2.24E-07	4
H1H5778P	5.52E+03	1.54E-04	2.78E-08	75
H1H5780P	1.31E+04	3.99E-04	3.04E-08	29
H1H5781P	8.61E+03	4.97E-04	5.77E-08	23
H1H5782P	NB	NB	NB	NB
H1H5785B	NT	NT	NT	NT
H1H5786B	1.26E+04	1.08E-03	8.54E-08	11
H1H5788P	2.88E+03	2.91E-04	1.01E-07	40
H1H5790B	1.82E+04	5.17E-04	2.83E-08	22
H1H5791B	1.09E+04	7.90E-04	7.25E-08	15
H1H5792B	NT	NT	NT	NT
H1H5793B	8.54E+03	3.82E-04	4.47E-08	30
H1H5795B	1.73E+04	5.76E-04	3.33E-08	20
H1H5796B	1.47E+04	8.91E-04	6.05E-08	13
H1H5797B	NT	NT	NT	NT
H1H5798B	NT	NT	NT	NT

H1H5799P	1.36E+04	7.88E-03	5.79E-07	1
H1H5801B	6.57E+03	1.62E-03	2.46E-07	7
OKT3	2.10E+06	2.00E+00	1.00E-06	0.35 sec

Tabelul 25: Afinitățile de Legare Biacore ale mAb-urilor Fc Umane (H1H)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T_C (min)
H1H2690N	NT	NT	NT	NT
H1H2712N	8.93E+04	8.68E-05	9.71E-10	133
H1H5751P	7.24E+04	2.47E-04	3.42E-09	47
H1H5752P	NB	NB	NB	NB
H1H5753B	NT	NT	NT	NT
H1H5755B	2.15E+05	2.01E-04	9.36E-10	57
H1H5756B	1.44E+05	1.11E-04	7.67E-10	105
H1H5757B	1.80E+05	2.95E-04	1.64E-09	39
H1H5758B	1.42E+05	5.62E-04	3.97E-09	21

continuare (25)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T_C (min)
H1H5761P	2.11E+05	1.13E-02	5.34E-08	1
H1H5763P	1.84E+05	1.70E-02	9.24E-08	1
H1H5764P	3.50E+05	7.36E-03	2.10E-08	2
H1H5769P	1.19E+05	5.23E-04	4.41E-09	22
H1H5771P	9.23E+05	3.42E-04	3.71E-10	34
H1H5772S	5.19E+05	8.69E-04	1.67E-09	13
H1H5777P	4.83E+05	1.70E-03	3.52E-09	7
H1H5778P	3.99E+05	3.42E-05	8.56E-11	338
H1H5780P	4.78E+05	1.71E-04	3.58E-10	68
H1H5781P	1.40E+05	2.68E-04	1.92E-09	43
H1H5782P	NB	NB	NB	NB
H1H5785B	NT	NT	NT	NT
H1H5786B	3.00E+06	4.24E-04	1.41E-10	27
H1H5788P	7.06E+04	1.64E-04	2.33E-09	70
H1H5790B	9.25E+05	2.36E-04	2.54E-10	49
H1H5791B	7.86E+05	3.40E-04	4.33E-10	34
H1H5792B	NT	NT	NT	NT
H1H5793B	4.78E+05	1.59E-04	3.33E-10	73
H1H5795B	1.58E+06	2.29E-04	1.45E-10	50
H1H5796B	1.05E+05	2.44E-04	2.32E-09	47
H1H5797B	NT	NT	NT	NT

H1H5798B	NT	NT	NT	NT
H1H5799P	7.18E+05	5.64E-03	7.85E-09	2
H1H5801B	3.31E+05	1.12E-03	3.38E-09	10
OKT3	3.94E+06	2.18E-02	5.53E-09	0.5

Tabelul 26: Afinitățile de Legare Biacore ale mAb-urilor Monovalente cu 1 Braț

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T° (min)
H1H7194P	1.16E+04	1.51E-04	1.30E-08	76
H1H7195P	3.13E+04	9.89E-05	3.16E-09	117
H1H7196P	1.07E+04	4.43E-04	4.13E-08	26
H1H7198P	2.63E+04	1.58E-04	6.02E-09	73
H1H7203P	1.46E+04	2.67E-04	1.83E-08	43
H1H7204P	1.43E+04	3.62E-04	2.53E-08	32
H1H7208P	NT	NT	NT	NT

continuare (26)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T° (min)
H1H7211P	1.41E+04	1.59E-04	1.13E-08	73
H1H7221P	1.07E+04	2.92E-04	2.75E-08	40
H1H7223P	1.60E+04	3.07E-04	1.92E-08	38
H1H7226P	1.30E+04	3.55E-04	2.72E-08	33
H1H7232P	8.03E+03	1.77E-03	2.20E-07	7
H1H7233P	1.11 E+04	2.69E-04	2.42E-08	43
H1H7241P	1.34E+04	2.95E-04	2.20E-08	39
H1H7242P	2.15E+04	6.64E-04	3.09E-08	17
H1H7250P	2.34E+04	2.47E-04	1.05E-08	47
H1H7251P	2.56E+04	1.07E-03	4.17E-08	11
H1H7254P	2.60E+04	3.88E-04	1.49E-08	30
H1H7258P	1.26E+04	3.02E-04	2.40E-08	38
H1H7269P	2.57E+04	6.24E-03	2.43E-07	2
H1H7279P	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G	NT	NT	NT	NT
H1xH7221G3	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G5	NB	NB	NB	NB

5

Tabelul 27: Afinitățile de Legare Biacore ale mAb-urilor Monovalente cu 1 Braț

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	T° (min)
H1H7194P	3.50E+05	8.43E-05	2.41E-10	137
H1H7195P	5.66E+05	7.14E-05	1.26E-10	162

H 1H7196P	1.85E+05	4.61E-04	2.49E-09	25
H1H7198P	6.28E+05	7.07E-05	1.12E-10	163
H1H7203P	4.79E+05	2.38E-04	4.98E-10	48
H1H7204P	1.73E+05	3.65E-04	2.12E-09	32
H1H7208P	NT	NT	NT	NT
H1H7211P	3.45E+05	9.61E-05	2.79E-10	120
H1H7221P	1.36E+05	2.39E-04	1.75E-09	48
H1H7223P	1.87E+05	2.86E-04	1.53E-09	40
H1H7226P	4.18E+05	2.36E-04	5.65E-10	49
H1H7232P	1.49E+05	1.49E-03	1.00E-08	8
H1H7233P	1.61E+05	2.04E-04	1.27E-09	57
H1H7241P	1.87E+05	2.36E-04	1.26E-09	49
H1H7242P	3.83E+05	1.01E-03	2.63E-09	11

Continuare (27)

Legare la 25°C / Format de Captare Anticorp				
Anticorp	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (Molar)	T _C (min)
H1H7250P	2.31E+05	1.89E-04	8.20E-10	61
H1H7251P	4.47E+05	1.19E-03	2.67E-09	10
H1H7254P	4.33E+05	3.30E-04	7.62E-10	35
H1H7258P	1.33E+05	2.90E-04	2.18E-09	40
H1H7269P	2.77E+05	6.89E-03	2.49E-08	2
H1H7279P	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G	NT	NT	NT	NT
H1xH7221G3	NB	NB	NB	NB
H1xH7221G5	NB	NB	NB	NB

- 5 Aşa cum se arată în tabelele 22-27, câțiva anticorpi anti-CD3 leagă CD3, fie în formate de
captare a anticorpilor, fie în formate de captare a antigenului, cu afinitate mare.

Exemplul 14: Anticorpii anti-CD3 se Leagă și Proliferează Celulele T Umane

- 10 Anticorpii anti-CD3 din prezenta invenție au fost testați pentru capacitatea lor de a se lega de
celulele T umane și de a induce proliferarea acestora. Legarea a fost evaluată folosind celule Jurkat (o
linie de celule T umane CD3+), în timp ce proliferarea celulelor mononucleare din sânge periferic
(PBMC) a fost evaluată utilizând cuantificare catalizată ATP (CellTiter Glo®). Anticorpul anti-CD3
OKT3 a acționat ca un control pozitiv și anticorpii irelevanți potriviți cu izotipul au servit ca martori
negativi.

- 15 Datele FACS au fost obținute folosind următorul protocol: Celulele la 2x10⁵ per godeu au fost
incubate cu anticorpi diluați în serie timp de 30 de minute pe gheață. După incubare, celulele au fost
spălate și anticorpul secundar a fost adăugat și incubat timp de încă 30 de minute. După incubare, celulele
au fost spălate, resuspendate în PBS rece care conține 1% BSA și analizate prin citometrie în flux cu
celule Jurkat viabile încadrate prin împrăștiere laterală și înainte. EC₅₀s pentru titrarea legării celulelor au
20 fost determinate utilizând software-ul Prism cu valori calculate utilizând o analiză de regresie neliniară cu
4 parametri.

Datele de proliferare au fost obținute folosind următorul protocol: PBMC umane (5x10⁴/godeu)
au fost incubate cu o diluție în serie de 3 ori de anti-CD3 și o concentrație fixă a unui anticorp comercial

anti-CD28 (200ng/ml) în plăci cu 96 de godeuri pentru 72 ore la 37°C. După incubare, a fost adăugat CellTiter Glo® și luminiscenta a fost măsurată utilizând un cititor de plăci cu mai multe etichete VICTOR X5 (PerkinElmer). EC₅₀ a viabilității celulare (cuantificare catalizată ATP) a fost calculat utilizând o analiză de regresie neliniară cu 4 parametri în GraphPad Prism.

5 Rezultatele experimentelor de legare și proliferare sunt rezumate în Tabelele 28-30.

Tabelul 28: mAbs anti-CD3 de hibridom se leagă și proliferază celulele T umane

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H2M2689N	NB	0.00E+00
H2M2690N	4.37E-09	5.37E-12
H2M2691N	6.77E-09	3.43E-11
H1M2692N	5.99E-09	1.42E-10
H2M2704N	8.45E-10	2.93E-12
H2M2705N	2.96E-10	1.76E-11
H2M2706N	2.37E-09	3.86E-12
H2M2707N	1.24E-07	1.92E-12
H2M2708N	6.58E-10	2.69E-08
H2M2709N	7.11E-10	2.48E-11
H2M2710N	7.10E-10	2.11E-10

Continuare (28)

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H2M2711N	1.16E-09	6.48E-10
H1M2712N	2.19E-08	1.28E-10
H2M2774N	3.52E-10	4.92E-10
H2M2775N	1.32E-09	1.09E-09
H2M2776N	4.91E-10	2.84E-11
H2M2777N	2.16E-09	2.51E-11
H2M2778N	3.62E-09	0.00E+00
H2M2779N	NT	0.00E+00
H2M2789N	NT	2.85E-08
H2M2862N	7.68E-09	6.72E-13
H2M2885N	2.09E-09	2.49E-12
H2M2886N	3.97E-09	2.69E-12
H2M3540N	3.99E-09	3.16E-12
H2M3541N	3.70E-09	6.40E-12
H1M3542N	2.01E-09	0.00E+00
H2M3543N	5.63E-09	6.12E-12
H 1 M3544N	2.32E-08	0.00E+00
H2M3547N	2.71E-09	5.02E-12
H2M3548N	1.10E-09	1.89E-12
H1M3549N	2.30E-09	0.00E+00
H2M3563N	1.07E-09	7.74E-12

H1M3613N	1.03E-08	0.00E+00
Isotype Ctrl	NB	0.00E+00
NB: Fără Legare; NT: Netestat		

Tabelul 29: mAb-urile anti-CD3 Fc umane se leagă și proliferază celulele T umane

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H1H5751P	2.12E-09	9.29E-12
H1H5752P	3.43E-10	1.09E-12
H1H5753B	NB	9.14E-11
H1H5755B	1.23E-09	4.24E-12
H1H5756B	NB	0.00E+00
H1H5757B	3.38E-09	4.86E-12
H1H5758B	1.90E-09	2.13E-12
H1H5761P	2.10E-09	3.62E-13
H1H5763P	2.76E-09	3.11E-13
H1H5764P	8.80E-10	3.27E-13

continuare (29)

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H1H5769P	4.10E-09	6.17E-12
H1H5771P	NT	6.35E-12
H1H5772S	6.64E-10	4.42E-12
H1H5777P	5.71E-10	3.04E-12
H1H5778P	6.85E-10	5.04E-12
H1H5780P	7.62E-10	3.44E-12
H1H5781P	1.23E-09	6.08E-12
H1H5782P	NB	5.17E-12
H1H5785B	NB	0.00E+00
H1H5786B	1.10E-09	1.79E-12
H1H5788P	3.53E-09	4.62E-12
H1H5790B	3.55E-09	2.71E-12
H1H5791B	3.77E-09	1.75E-12
H1H5792B	5.87E-09	6.47E-12
H1H5793B	4.62E-09	3.28E-12
H1H5795B	2.04E-09	3.09E-12
H1H5796B	9.82E-09	4.37E-12
H1H5797B	3.96E-08	1.07E-11
H1H5798B	5.57E-09	2.59E-12
H1H5799P	NT	1.63E-13
H1H5801B	1.55E-08	1.09E-12
OKT3	1.96E-10	3.30E-13

Isotype Ctrl	NB	0.00E+00
NB: Fără Legare; NT: Netestat		

Tabelul 30: mAbs anti-CD3 monovalent cu 1 braț se leagă și proliferază celulele T umane

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H1H7194P	1.50E-09	2.37E-12
H1H7195P	3.42E-10	2.42E-12
H1H7196P	3.44E-08	1.27E-12
H1H7198P	7.26E-10	2.55E-12
H1H7203P	3.24E-09	1.64E-12
H1H7204P	2.29E-09	1.51E-12
H1H7208P	5.19E-08	1.46E-12
H1H7211P	7.01E-10	2.75E-12
H1H7221P	1.40E-09	2.60E-12
H1H7223P	9.37E-10	1.07E-12

5

continuare (30)

Antibody	EC ₅₀ [M] FACS JURKAT	EC ₅₀ [M] hPBMC Proliferare
H1H7226P	7.95E-10	9.52E-13
H1H7232P	1.50E-09	1.03E-12
H1H7233P	7.15E-10	7.34E-13
H1H7241P	1.01E-09	1.05E-12
H1H7242P	1.83E-09	2.13E-12
H1H7250P	1.37E-09	2.43E-12
H1H7251P	1.45E-09	1.30E-12
H1H7254P	1.09E-09	2.80E-12
H1H7258P	1.07E-09	2.17E-12
H1H7269P	1.95E-09	1.15E-12
H1H7279P	NB	0.00E+00
Isotype Ctrl	NB	0.00E+00
NB: Fără Legare; NT: Netestat		

După cum se arată în Tabelele 7-9, marea majoritate a anticorpilor anti-CD3 ai invenției au legat celulele T umane și au indus proliferarea celulelor T.

10

Exemplul 15: Anticorpul anti-CD3 se leagă și Proliferează Celulele T de Maimuță

Un subset de anticorpi anti-CD3 a fost testat pentru capacitatea de a se lega și de a induce proliferarea celulelor T de maimuță.

15

Datele FACS au fost obținute folosind următorul protocol: Celulele la 2×10^5 per godeu au fost incubate cu anticorpi diluați în serie timp de 30 de minute pe gheață. După incubare, celulele au fost spălate și au fost adăugați anticorpi secundari și incubati pentru încă 30 de minute. După incubare, celulele au fost spălate, resuspendate în PBS rece conținând 1 % BSA și analizate prin citometrie în flux. Celulele T de maimuță CD4⁺ au fost încadrate prin împrăștiere laterală și înainte și pe populația

CD2+CD4+CD20-. EC₅₀s pentru titrarea legării celulelor au fost calculate utilizând o analiză de regresie neliniară cu 4 parametri în GraphPad Prism.

Datele de proliferare au fost obținute folosind următorul protocol: PBMC derivate de maimuță cynomolgus proaspăt izolate (5×10^4 /godeu) au fost incubate cu o diluție în serie de 3 ori de anticorp anti-CD3 și o concentrație fixă a unui anticorp comercial anti-CD28 (500 ng/ml) anticorp în plăci cu 96 de godeuri timp de 72 ore la 37°C. După incubare, a fost adăugat CellTiter Glo® și luminiscenta a fost măsurată utilizând un cititor de plăci cu mai multe etichete VICTOR X5 (PerkinElmer).

EC₅₀ a viabilității celulare (cuantificare catalizată ATP) a fost calculată utilizând o analiză de regresie neliniară cu 4 parametri în GraphPad Prism.

Rezultatele experimentelor de legare și proliferare sunt rezumate în Tabelele 31 și 32.

Tabelul 31: mAbs anti-CD3 se leagă și proliferază PBMC-uri de maimuță

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS PBMCs	EC ₅₀ [M] mfPBMC Proliferation
H1H2690N	5.66E-09	2.71E-12
H1H2712N	2.29E-09	2.72E-12
H2M3547N	1.12E-10	NT
H2M3563N	1.65E-10	NT
H1H5761P	NT	2.81E-09
H1H5763P	NT	0.00E+00
H1H5764P	NT	4.06E-10
H1H5769P	NT	8.33E-13

Continuare (31)

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS PBMCs	EC ₅₀ [M] mfPBMC Proliferare
H1H5771P	NT	2.74E-12
H1H5772S	NT	1.47E-12
H1H5778P	NT	5.93E-13
H1H5780P	NT	3.13E-13
H1H5781P	NT	7.92E-13
H1H5788P	NT	2.01E-12
OKT3	NB	NT
SP34	7.03E-11	1.71E-12
NB: Fără Legare; NT: Netestat		

Tabelul 32: mAb-uri monovalente anti-CD3 cu 1 braț se leagă și proliferază PBMC-uri de maimuță

Anticorp	EC ₅₀ [M] FACS PBMCs	EC ₅₀ [M] mfPBMC Proliferare
H1H7194P	NT	4.84E-12
H1H7195P	NT	1.36E-12
H1H7196P	NT	1.40E-08
H1H7198P	NT	2.29E-12
H1H7203P	NT	4.97E-13
H1H7204P	NT	1.26E-11
H1H7208P	NT	7.02E-12

H1H7211P	NT	2.81E-13
H1H7221P	NT	1.72E-12
H1H7223P	NT	6.75E-11
H1H7226P	NT	2.26E-11
H1H7232P	NT	4.90E-11
H1H7233P	NT	4.35E-12
H1H7241P	NT	2.05E-11
H1H7242P	NT	1.38E-11
H1H7250P	NT	7.27E-11
H1H7251P	NT	1.83E-11
H1H7254P	NT	8.88E-11
H1H7258P	NT	1.11E-11
NB: Fără Legare; NT: Netestat		

După cum se arată în Tabelele 31 și 32, câțiva anticorpi anti-CD3 ai invenției au legat celulele T de maimuță CD2+CD4+ și au indus proliferarea acestora. OKT3 nu a condus proliferarea PBMC de maimuță, în timp ce SP34 a fost activ împotriva PBMC de maimuță.

Exemplul 16: mAb-urile anti-CD3 sprijină distrugerea celulelor tumorale mediată de celulele T

Capacitatea anticorpilor anti-CD3 de a redirecționa distrugerea mediată de celule T prin interacțiunile Fc/FcR a fost studiată utilizând un test de ucidere U937 pe bază de calceină. Pe scurt, PBMC umane au fost izolate peste Ficoll-Paque și activate în decurs de câteva zile cu medii care conțineau IL-2 umană (30 U/ml) și granule de activare a celulelor T (anti-CD3/CD28).

Celulele U937 au fost marcate cu calceină și apoi incubate cu celule T activate la un raport efector:țintă de 10:1 utilizând diluții în serie de 3 ori de anticorpi pe o perioadă de 3 ore la 37°C. După incubare, plăcile au fost centrifugate și supernatanții au fost transferați pe o placă de fund transparent neagră translucidă pentru analiza fluorescenței. Valorile EC₅₀, definite ca concentrația molară de anticorp CD3 care induce 50% citotoxicitate, au fost calculate utilizând o analiză de regresie neliniară cu 4 parametri în GraphPad Prism. Rezultatele utilizând anticorpi de hibridom, anticorpi umani Fc și anticorpi monovalenți cu un singur braț sunt prezentate în Tabelele 33, 34 și, respectiv, 35.

Tabelul 33: mAbs anti-CD3 de hibridom redirecționează distrugerea celulelor T către celulele U937

Anticorp	Citotoxicitate U937 a Celulelor T Umane [M]
H2M2689N	0.00E+00
H2M2690N	2.79E-11
H2M2691N	2.34E-11
H1M2692N	3.59E-10
H2M2704N	2.49E-12
H2M2705N	1.73E-12
H2M2706N	7.91E-12
H2M2707N	7.21E-12
H2M2708N	3.27E-12
H2M2709N	3.47E-12

H2M2710N	3.97E-12
H2M2711N	3.66E-12
H1M2712N	3.14E-10
H2M2774N	2.46E-12
H2M2775N	3.38E-12
H2M2776N	4.06E-12
H2M2777N	4.86E-12
H2M2778N	0.00E+00
H2M2779N	6.75E-10
H2M2789N	NT
H2M2862N	7.66E-12
H2M2885N	3.71E-12
H2M2886N	8.06E-12
H2M3540N	1.25E-11
H2M3541N	5.39E-11
H1M3542N	2.92E-11
H2M3543N	1.31E-11
H1M3544N	1.72E-10
H2M3547N	3.17E-11
H2M3548N	5.50E-12
H1M3549N	1.07E-10
H2M3563N	4.05E-11

Continuare (33)

Anticorp	Citotoxicitate U937 a Celulelor T Umane [M]
H1M3613N	8.66E-10
Izotip Ctrl	0.00E+00
NT: Netestat	

Tabelul 34: Uciderea celulelor T de redirectionare a mAbs anti-CD3 formatat cu Fc uman

Anticorp	Citotoxicitate U937 a Celulelor T Umane [M]
H1H5751P	1.30E-10
H1H5752P	1.85E-11
H1H5753B	3.79E-10
H1H5755B	5.16E-11
H1H5756B	7.69E-11
H1H5757B	9.65E-11
H1H5758B	8.86E-08
H1H5761P	2.00E-12
H1H5763P	NT

H1H5764P	NT
H1H5769P	5.65E-11
H1H5771P	NT
H1H5772S	6.89E-13
H1H5777P	4.87E-13
H1H5778P	3.41E-13
H1H5780P	4.03E-12
H1H5781P	1.83E-12
H1H5782P	5.18E-12
H1H5785B	4.43E-11
H1H5786B	6.10E-11
H1H5788P	1.54E-11
H1H5790B	8.71E-11
H1H5791B	8.01E-11
H1H5792B	1.40E-10
H1H5793B	8.85E-11
H1H5795B	6.74E-11
H1H5796B	5.03E-10
H1H5797B	5.76E-10
H1H5798B	1.81E-10
H1H5799P	NT
H1H5801B	9.23E-11

Continuare (34)

Anticorp	Citotoxicitate U937 a Celulelor T Umane [M]
OKT3	2.35E-12
Izotip Ctrl	0.00E+00
NT: Netestat	

Tabelul 35

5 Uciderea celulelor T de redirectionare a mAbs anti-CD3 monovalent cu 1 brat

Anticorp	Citotoxicitate U937 a Celulelor T Umane [M]
H1H7194P	4.71E-12
H1H7195P	6.10E-12
H1H7196P	1.96E-11
H1H7198P	5.21E-12
H1H7203P	5.47E-12
H1H7204P	1.08E-11
H1H7208P	4.59E-11
H1H7211P	7.89E-12

H1H7221P	9.21E-12
H1H7223P	5.30E-12
H1H7226P	1.04E-11
H1H7232P	9.96E-12
H1H7233P	1.19E-11
H1H7241P	1.23E-11
H1H7242P	7.50E-12
H1H7250P	5.91E-12
H1H7251P	1.81E-12
H1H7254P	4.18E-12
H1H7258P	1.53E-11
H1H7269P	1.08E-11
H1H7279P	0.00E+00
Isotype Ctrl	0.00E+00
NT: Netestat	

După cum se arată în tabelele 33-35, majoritatea anticorpilor anti-CD3, precum și OKT3, au susținut uciderea mediată de celule T redirecționate în acest sistem de analiză. Uciderea observată, care se crede a fi dependentă de angajarea Fc a anticorpului cu receptorul Fc de pe celulele U937, conducând la gruparea CD3 pe celulele T adiacente, a fost eliminată prin adăugarea de IgG umană nespecifică (datele nu sunt prezentate).

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2011/121110
- Ralf Lutterbuese ET AL: "Preclinical characterization of MT112/BAY 2010112, a novel PSMA/CD3-bispecific BiTE antibody for the treatment of prostate cancer", , 15 April 2011 (2011-04-15), XP055251943, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/4561 [retrieved on 2016-02-22]
- BAUM VOLKER ET AL: "Antitumor activities of PSMA*CD3 diabodies by redirected T-cell lysis of prostate cancer cells", IMMUNOTHERAPY, FUTURE MEDICINE, LONDON, vol. 5, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01) , pages 27-38, XP002758546, ISSN: 1750-7448
- WO-A1-2013/145714
- WO-A2-2010/037836
- FRIEDRICH: "Abstract 3526: Subcutaneous administration of PSMA/CD3-bispecific BiTE antibody MT112/BAY 2010112 leads to complete remission of human prostate cancer xenografts in mice | Cancer Research", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 8 Supplement, 15 April 2012 (2012-04-15), page 3526, XP055306961, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2012-3526
- KERSTIN FORTMÜLLER ET AL: "Effective targeting of prostate cancer by lymphocytes redirected by a PSMA * CD3 bispecific single-chain diabody", PROSTATE, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 71, no. 6, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 588-596, XP002648688, ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/PROS.21274 [retrieved on 2010-10-13]
- WO-A2-2013/158856
- BÜHLER P ET AL: "A bispecific diabody directed against prostate-specific membrane antigen and CD3 induces T-cell mediated lysis of prostate cancer cells", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 57, no. 1, 20 June 2007 (2007-06-20), pages 43-52, XP019561052, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0348-6

(57) Revendicări:

1. O moleculă bispecifică de legătură la un antigen care cuprinde un prim domeniu de legătură la antigenul care se leagă specific la CD3 uman, și un al doilea domeniu de legătură la antigen care se leagă specific la PSMA uman,

în care primul domeniu de legătură la antigen care se leagă specific la CD3 uman cuprinde o regiune variabilă de lanț greu (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1514 sau SEQ ID NR: 1618 și o regiune variabilă de lanț ușor (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1386, și

în care al doilea domeniu de legătură la antigen care se leagă specific la PSMA uman cuprinde o regiune variabilă de lanț greu (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 66, și o regiune variabilă de lanț ușor (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1386.

2. Molecula bispecifică de legătură la un antigen conform revendicării 1, în care primul domeniu de legătură la antigen care se leagă specific la CD3 uman cuprinde o HCVR cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1514.

3. Molecula bispecifică de legătură la un antigen conform revendicării 1, în care primul domeniu de legătură la antigen care se leagă specific la CD3 uman cuprinde o HCVR cuprinzând secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1618.

4. Molecula bispecifică de legătură la un antigen conform vreuneia din revendicările de la 1 la 3, în care:

(i) al doilea domeniu de legătură la antigen se leagă la celulele umane care exprimă PSMA uman și la celulele de maimuță cynomolgus care exprimă PSMA cynomolgus;

(ii) molecula de legătură la antigen inhibă creșterea tumorală la șoareci imuno-deprimați care poartă xenogrefe de cancer de prostată uman;

(iii) molecula de legătură la antigen inhibă creșterea tumorală la șoareci imuno-competenți care poartă xenogrefe de cancer de prostată uman;

(iv) molecula de legătură la antigen inhibă creșterea tumorală a tumorilor formate la șoareci imuno-deprimați care poartă xenogrefe de cancer de prostată uman; sau

(v) molecula de legătură la antigen reduce creșterea tumorală a tumorilor formate la șoareci imuno-competenți care poartă xenogrefe de cancer de prostată uman.

5. Molecula bispecifică de legătură la un antigen conform vreuneia din revendicările de la 1 la 4, în care:

(i) molecula de legătură la antigen induce distrugerea celulelor tumorale mediată de limfocitele T cu o valoare EC_{50} mai mică de 1,3 nM, așa cum este măsurată într-un test *in vitro* de distrugere a celulelor tumorale mediată de limfocitele T; și/sau

(ii) al doilea domeniu de legătură la antigen se leagă specific la PSMA uman cu o valoare K_D mai mică de aproximativ 80 nM, așa cum este măsurată într-un test *in vitro* de legătură prin rezonanță plasmodică de suprafață; și/sau

(iii) al doilea domeniu de legătură la antigen se leagă specific la fiecare din PSMA umane cu o valoare K_D mai mică de aproximativ 5 nM, mai mică de aproximativ 2 nM, mai mică de aproximativ 1 nM, mai mică de aproximativ 800 pM, sau mai mică de aproximativ 600 pM, așa cum este măsurată într-un test *in vitro* de legătură prin rezonanță plasmodică de suprafață.

6. Molecula bispecifică de legătură la un antigen conform vreuneia din revendicările de la 1 la 5, care este un anticorp bispecific sau un fragment bispecific de legătură la antigen a acestuia.

7. Compoziție farmaceutică cuprinzând molecula bispecifică de legătură la antigen conform vreuneia din revendicările de la 1 la 6 și un suport sau diluant acceptabil farmaceutic.

8. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7 pentru o utilizare într-un procedeu de tratament al unui cancer la un subiect.

9. Compoziție farmaceutică pentru o utilizare conform revendicării 8, în care cancerul este ales din grupul constituit de cancerul de prostată, cancerul de rinichi, cancerul de vezică, cancerul colorectal și cancerul gastric.

10. Compoziție farmaceutică pentru o utilizare conform revendicării 8, în care cancerul este un cancer de prostată rezistent la castrare.

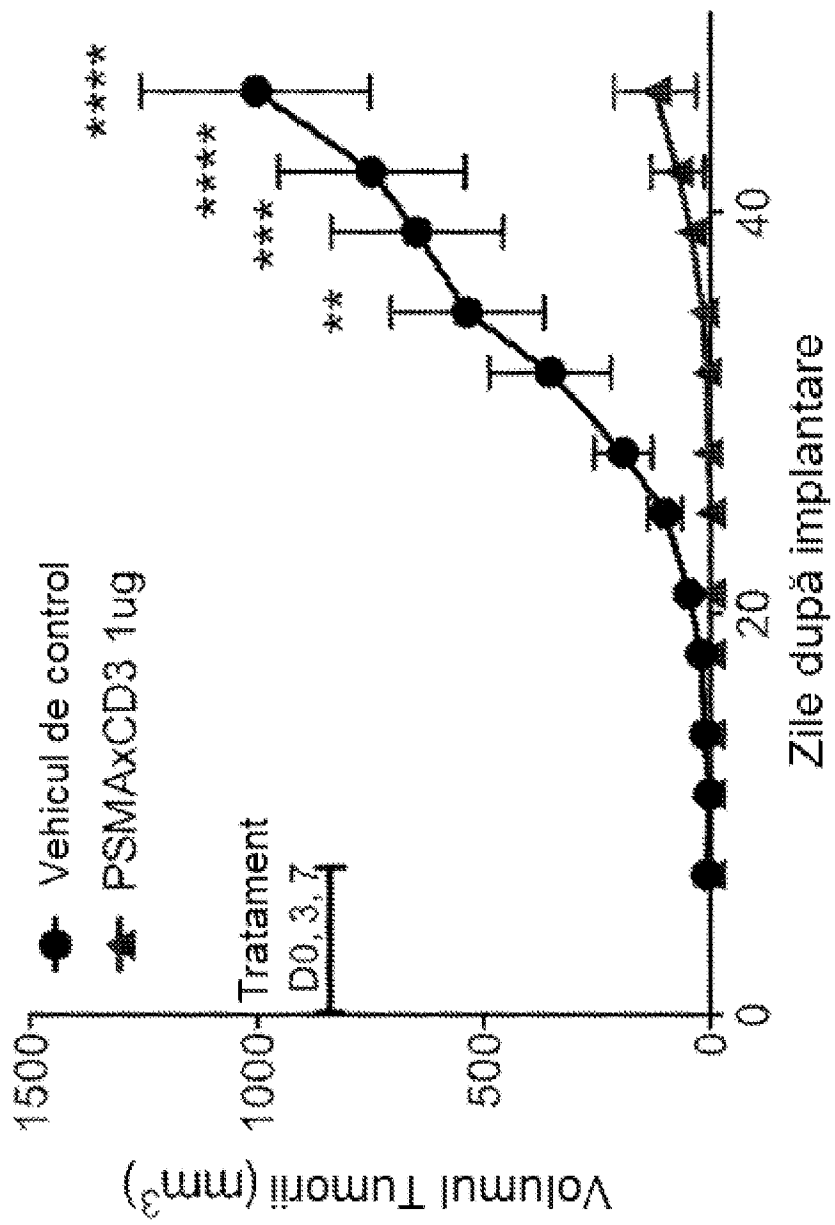


FIG. 1

Tratament cu anticorp bispecific PSMAxCD3 induce o creștere tranzitorie dependentă a dozei citokinelor

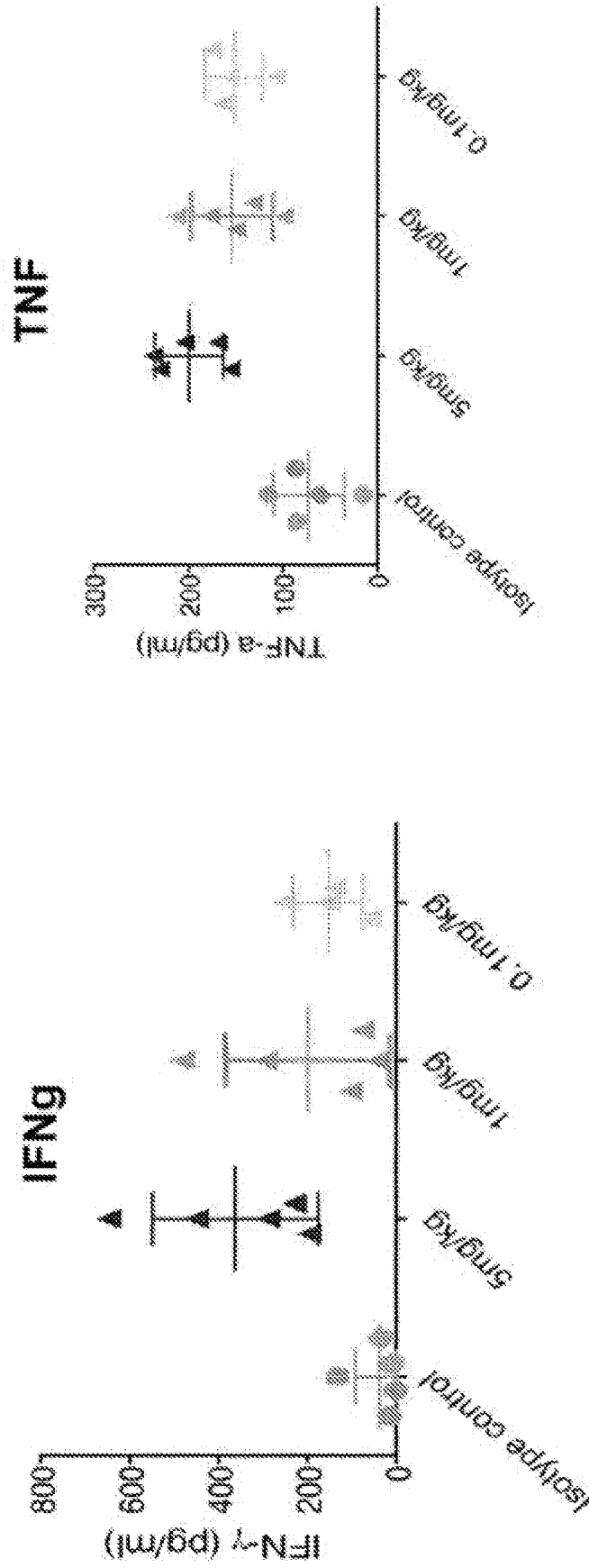


FIG. 2A

FIG. 2B

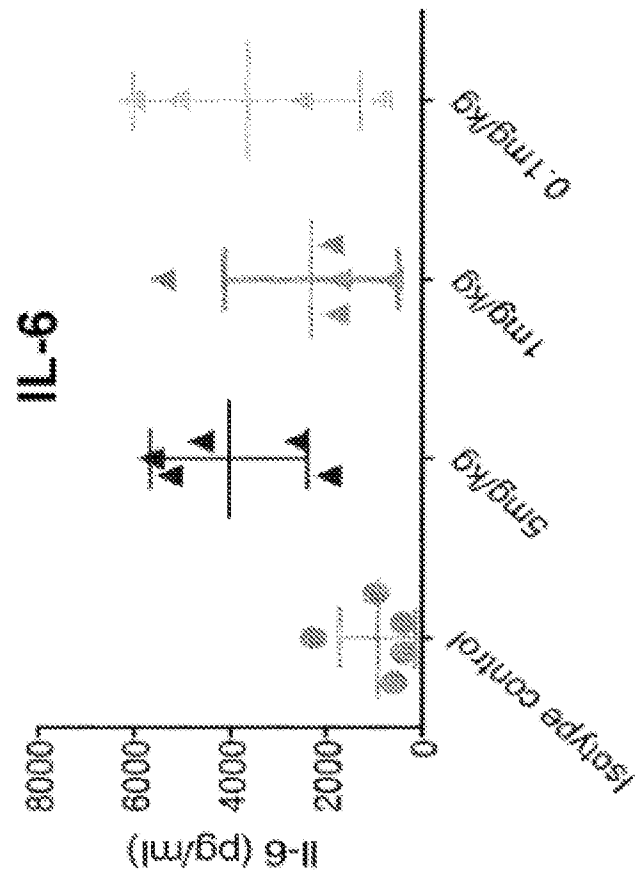


FIG. 2D

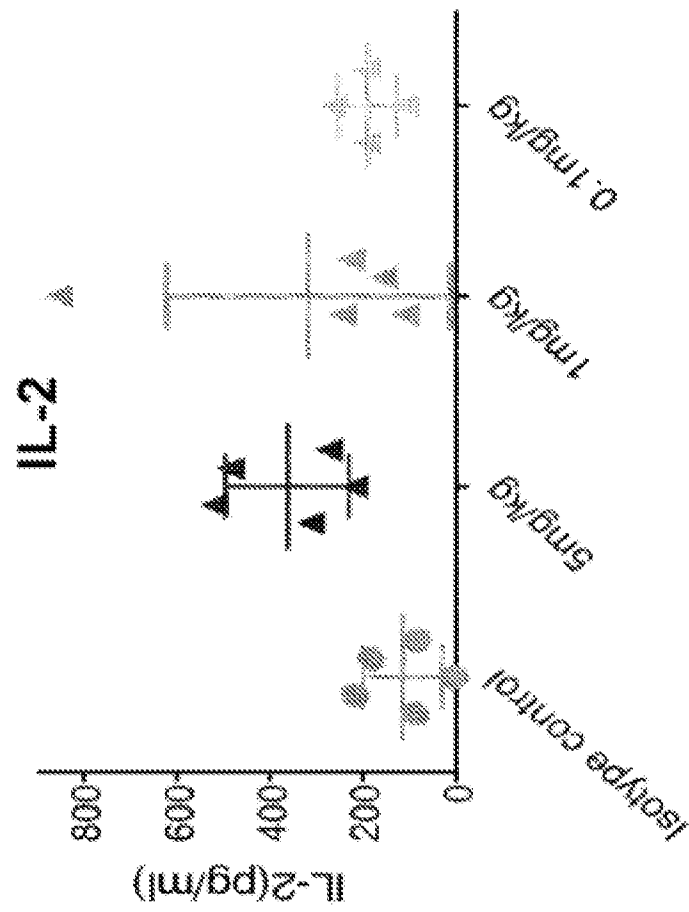
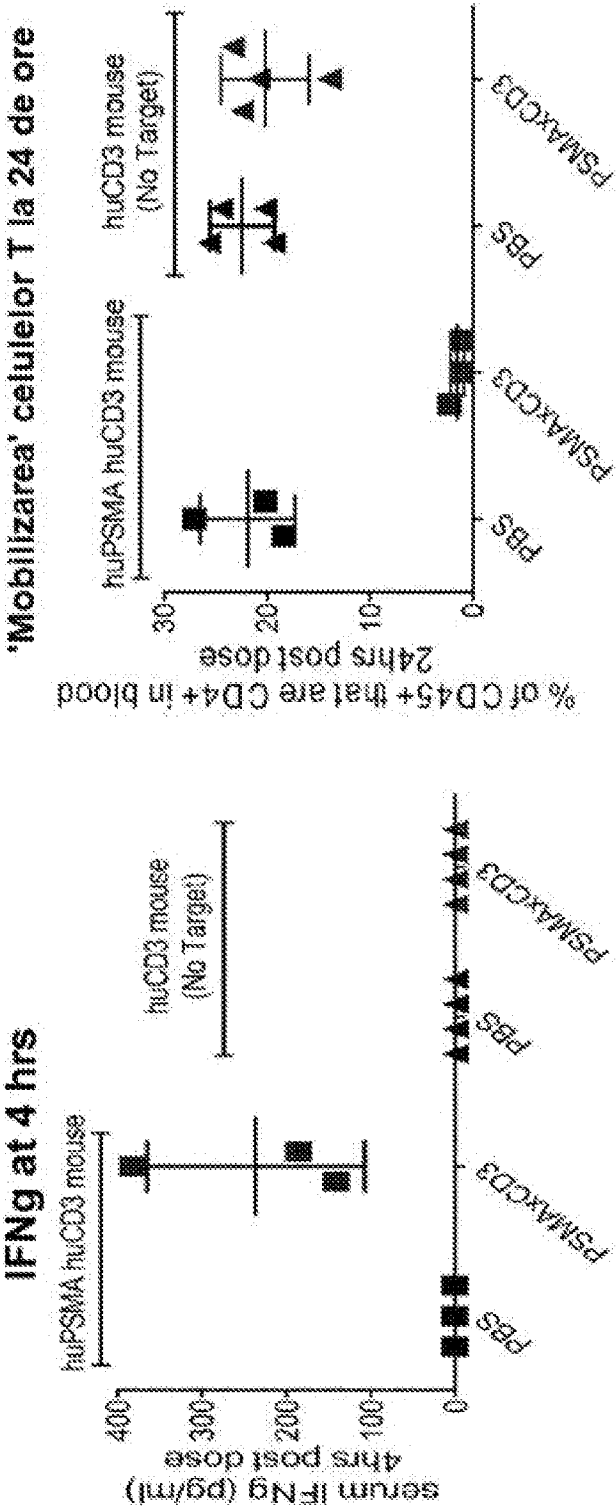


FIG. 2C

Șoarecii umanizați reproduc citokine
și modificări ale celulelor T



Anticorpul bispecific PSMAxCD3 nu epuizează
celulele T efectoare din spina șoarecilor imunocompetenți

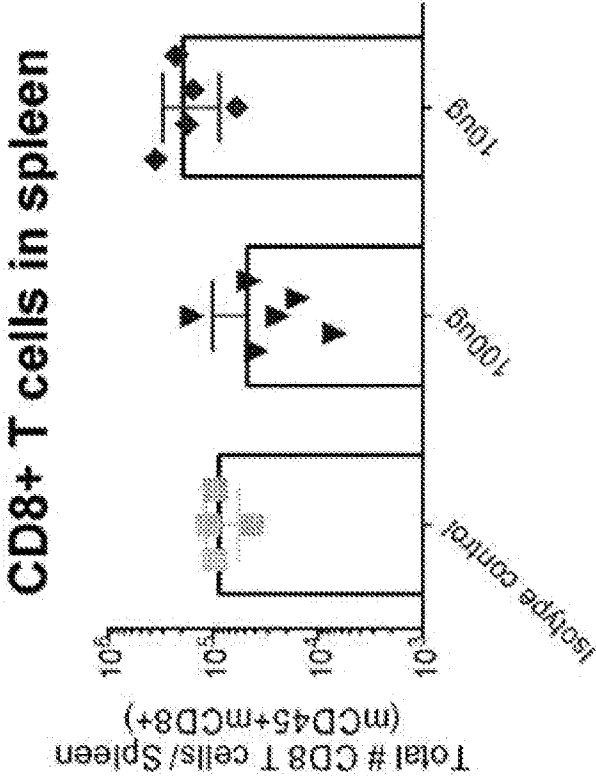


FIG. 4A

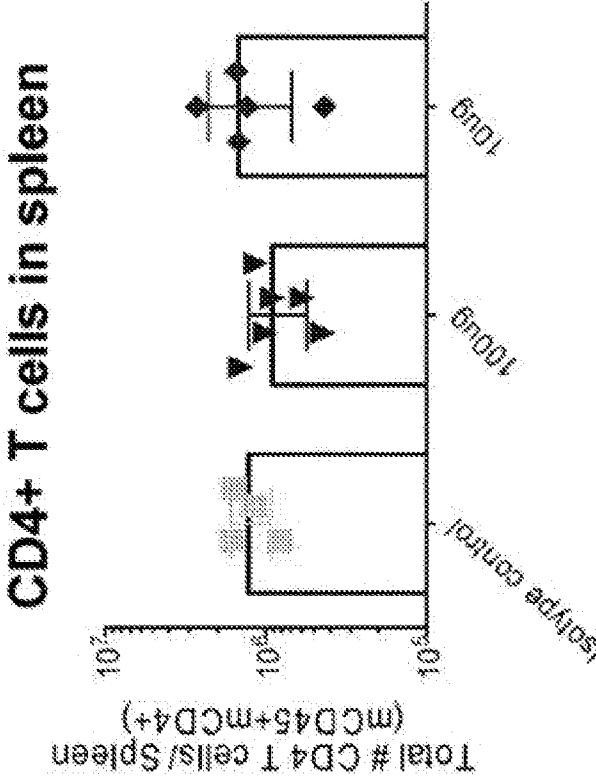


FIG. 4B

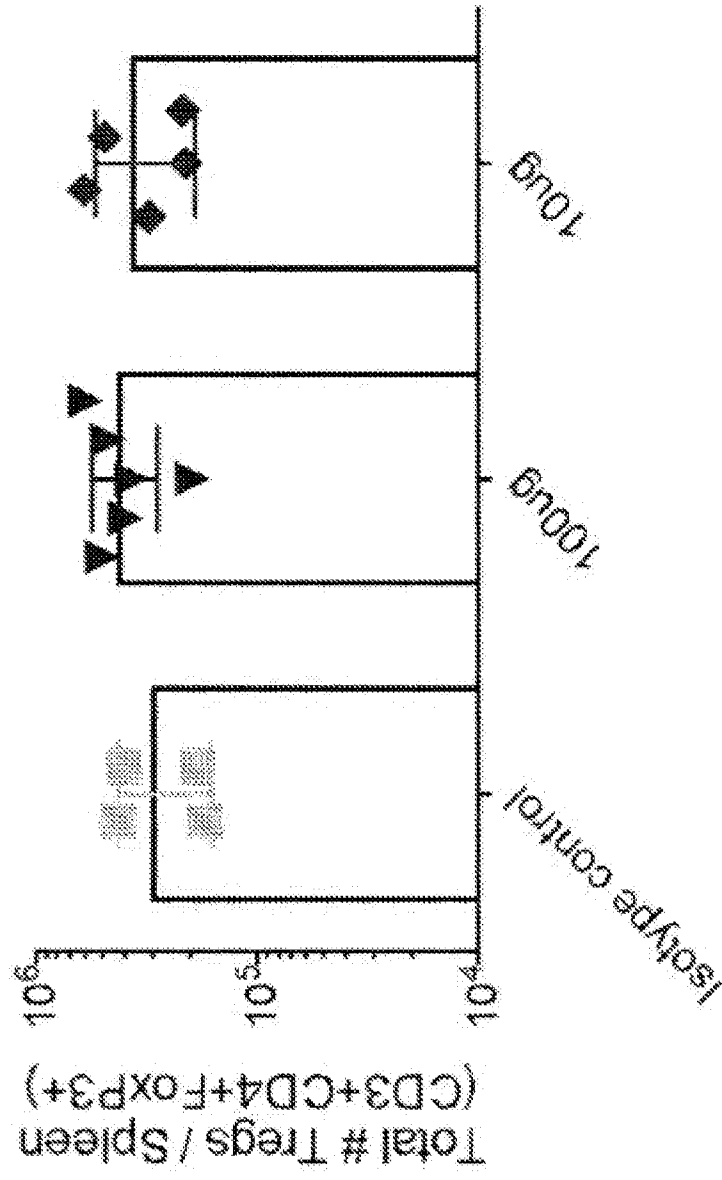


FIG. 4C