

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992311** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.15

(22) Дата подачи заявки
2018.03.28

(51) Int. Cl. *C07K 16/46* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ГЕТЕРОДИМЕРНОЕ БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К PD-L1/PD-1 СО СТРУКТУРОЙ, ПОДОБНОЙ НАТУРАЛЬНОМУ АНТИТЕЛУ, И ЕГО ПОЛУЧЕНИЕ

(31) 201710214705.7

(32) 2017.04.01

(33) CN

(86) PCT/CN2018/080858

(87) WO 2018/177324 2018.10.04

(71) Заявитель:
БЭЙЦЗИН ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Лю Цзяван, Сун Наньмэн, Ян Япин,
Цзинь Менсэ (CN)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М. (RU)

(57) Предусматривается гетеродимерное биспецифичное антитело к PD-L1/PD-1 со структурой, подобной натуральному антителу, и его получение. В частности, предусматривается высокостабильное гетеродимерное биспецифичное антитело к PD-L1/PD-1 с характеристиками натурального IgG и без несоответствий тяжелой цепи-легкой цепи, а также его получение. Биспецифичное антитело может связываться с обеими молекулами-мишенями и является более эффективным в лечении сложного заболевания.

A1

201992311

201992311

A1

**ГЕТЕРОДИМЕРНОЕ БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К PD-L1/PD-1 СО
СТРУКТУРОЙ, ПОДОБНОЙ НАТУРАЛЬНОМУ АНТИТЕЛУ, И ЕГО
ПОЛУЧЕНИЕ**

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к гетеродимерному биспецифичному антителу к PD-L1/PD-1 со структурой, подобной натуральному антителу, и его получению. В частности, настоящее изобретение относится к высокостабильному гетеродимерному биспецифичному антителу к PD-L1/PD-1, имеющему характеристики натуральных IgG и не имеющему несоответствий тяжелой цепи-легкой цепи, и к способу их получения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Моноклональные антитела представляют собой высокоспецифичные антитела, которые действуют только на один антигенный эпитоп, и их широко применяли в лечении многочисленных заболеваний, таких как разновидности рака, воспалительные и аутоиммунные заболевания и инфекционные заболевания. Тем не менее, вследствие сложности заболеваний ни одна из таких терапевтических молекул не демонстрирует достаточную эффективность при использовании отдельно. Например, разновидности рака или воспалительные заболевания часто являются ассоциированными с различными опосредующими заболевание молекулярными путями и взаимодействиями путей передачи сигнала. В этих условиях молекулы, имеющие одну мишень, могут не обеспечивать оптимальные терапевтические эффекты, в то же время терапевтические эффекты могут быть улучшены молекулами, одновременно блокирующими несколько мишеней или несколько сайтов на одной мишени. Между тем, нацеленная на две мишени терапия с применением мультиспецифичной молекулы, такой как биспецифичная, может упростить разработку новых лекарственных средств, поскольку такая молекула представляет собой одну молекулу. По сравнению с комбинированным введением множества моноспецифичных молекул это будет более удобным как для пациентов, так и для медицинских работников.

В данной области сообщалось о многих различных форматах биспецифичных антител или бифункциональных молекул. Первое биспецифичное антитело получали с помощью химических способов с применением бифункциональных связующих реактивов для связывания воедино двух существующих молекул IgG, Fab' или (Fab')₂-фрагментов.

Тем не менее, такое химически связанное биспецифичное антитело имеет много ограничений, таких как интенсивность работ по получению, очистке гетерологичных конъюгатов, сложность в удалении гомологичных конъюгатов и исходных моноспецифичных антител или фрагментов, а также низкий выход.

В другом способе получения биспецифичных антител используется методика получения гибридной гибридомы (или квадромы), которую получают посредством соматической гибридизации двух линий клеток гибридом, которые секретируют различные антитела. Вследствие произвольного спаривания тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов на желаемое функциональное биспецифичное антитело приходится только одна десятая часть смеси антител, что усложняет процесс очистки и снижает выход при получении.

В международной заявке WO2013060867 описан способ массового получения гетеродимерного биспецифичного антитела, в котором два гомодимерных антитела вначале восстанавливают в смеси; затем асимметричные мутации аминокислот вводят в СНЗ участки двух гомодимерных антител для содействия обмену Fab-плечами между разными антителами; в конце образуется стабильное биспецифичное антитело при окислении дисульфидных связей между цепями в шарнирных участках.

В международной заявке WO2009089004 описан способ получения гетеродимерного белка, в котором аминокислоты на поверхности контакта СНЗ-СНЗ мутированы в заряженные аминокислоты, в результате чего образование гетеродимера является благоприятным, исходя из электростатических взаимодействий, в то время как образование гомодимера является неблагоприятным, исходя из электростатических взаимодействий.

В патентном документе US5731168 описан способ получения гетеродимерного IgG в соответствии со стратегией «выступ-в-полость», в котором «выступы» конструируют посредством замены мелких аминокислот на поверхности взаимодействия СНЗ участка в первой цепи на более крупные аминокислоты; в то же время, «полости» создают посредством замены соответствующих крупных аминокислот на поверхности взаимодействия СНЗ во второй цепи на меньшие аминокислоты. Взаимодействие выступа и полости является благоприятным для образования гетеродимерного IgG, но неблагоприятным для образования гомодимера.

В международной заявке WO2012058768 описан способ получения стабильного и высокоспецифичного гетеродимерного IgG. Этот способ объединяет как отрицательные, так и положительные решения вместе с методиками белковой инженерии на основании компьютерного моделирования структуры для мутирования множества аминокислот в СНЗ

домене IgG1, в результате чего образуется стабильный гетеродимерный IgG с низким содержанием гомодимерных примесей.

В качестве эффективных средств для улучшения эффективности антител может быть сконструировано бифункциональное антитело, способное к рекрутингу эффекторных клеток. До настоящего времени наиболее исследованной была реализация функции молекулы CD3. Посредством активации киллерных Т-клеток молекулой CD3 представляющая интерес опухоль может быть эффективно удалена (Haas C. *et al.*, *Immunobiology*, 214:441-453, 2009). Из вышеуказанных средств большие перспективы показало ViTE, которое представляет собой рекомбинантное бифункциональное стимулирующее Т-клетки антитело, разработанное Micromet, Inc. Тем не менее, наибольшей проблемой является то, что его период полужизни в сыворотке крови является очень коротким, и его период полужизни в организме человека составляет лишь 1 час (Loffler A. *et al.*, *Blood*, 95:2098-2103). Это объясняется самой структурой ViTE, которая состоит из двух одноцепочечных фрагментов антител с молекулярной массой только 60 кДа, и у которого в молекулах антитела отсутствуют Fc фрагменты, которые оказывают значительные воздействия на продление периода полужизни.

Катумаксомаб, как еще одно перспективное мультифункциональное антитело, представляет собой гибридную молекулу Ig, целенаправленно воздействующую на CD3 и EpCAM. В настоящее время этот продукт одобрен для лечения асцитного рака (Jager M. *et al.*, *Cancer Res*, 72:24-32, 2012). Еще одно мультифункциональное антитело, проходящее клиническое испытание фазы II, представляет собой эртумаксомаб, который целенаправленно воздействует на CD3 и PD-L1. Одну тяжелую цепь и одну легкую цепь гибридного антитела получают из крысиного IgG и целевого CD3; другие тяжелую цепь и легкую цепь получают из мышиноного IgG и целевого PD-L1. Следовательно, существует проблема, заключающаяся в том, что получение такого продукта является достаточно сложным, поскольку для получения клеточной линии, экспрессирующей бифункциональный эртумаксомаб, требуется квадрама, способная к экспрессии бифункционального антитела к CD3/PD-L1. Квадрому получают посредством получения вначале линии диплоидной гибридомы, экспрессирующей антитело к CD3, и линии диплоидной гибридомы, экспрессирующей антитело к PD-L1, а затем гибридизации двух линий гибридомы. В отличие от этого, только одна линия диплоидной гибридомы требуется для получения традиционного антитела, имеющего одну мишень. По сравнению с этим, процесс получения бифункционального антитела является более сложным, поскольку получить квадраму еще сложнее. Более того, мышиноное происхождение приводит в результате к его крайне высокой иммуногенности.

Кроме того, наиболее заметным побочным эффектом, вызванным антителом к CD3, является взрывной выброс цитокинов *in vivo* за короткий период времени, который также называется цитокиновым штормом. Соответственно, существует потребность в новом бифункциональном антителе, которое одновременно привлекает иммунные клетки к поверхности опухолевых клеток.

Рецептор 1 программируемой гибели клеток (PD-1) представляет собой иммунную контрольную точку, которая в последнее время привлекла много внимания. PD-1 является членом, относящимся к семейству CD28. В отличие от других членов семейства CD28, таких как CTLA4, способных к образованию ковалентного димера посредством дисульфидной связи, PD-1 существует в мономерной форме. Структура PD-1 в основном включает в себя подобный вариабельному участку иммуноглобулина внеклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен содержит два независимых сайта фосфорилирования: иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и иммунорецепторный тирозиновый переключаящий мотив (ITSM), соответственно. PD-1 преимущественно индуцируемо экспрессируется на поверхности активированных клеток Т-клеток, а также на В-клетках, NK-клетках, моноцитах и DC клетках. PD-1 преимущественно вовлечен в негативную регуляцию активации Т-клеток, и может регулировать силу и продолжительность иммунных реакций. Лиганды PD-1 включают в себя PD-L1 (лиганд 1 белка программируемой гибели) и PD-L2 (лиганд 2 белка программируемой гибели). Эти лиганды относятся к семейству B7. Как указано выше, PD-L1 индуцируемо экспрессируется на поверхности различных иммунных клеток, в том числе Т-клеток, В-клеток, моноцитов, макрофагов, DC клеток и эндотелиальных клеток, эпидермальных клеток и т.д., в то время как PD-L2 индуцируемо экспрессируется только на некоторых иммунных клетках, в том числе на макрофагах, DC клетках и В-клетках. PD-L1 действует не только как лиганд для PD-1, но также действует как лиганд для CD80, передает негативные регуляторные сигналы к Т-клеткам и индуцирует иммунологическую толерантность Т-клеток (Autoimmun Rev, 2013, 12(11):1091-1100. Front Immunol, 2013, 4:481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1): 24-33. Clin Cancer Res. 2012 Dec 15; 18(24):6580-7).

В нормальных условиях PD-1 и PD-L1 могут опосредовать и поддерживать аутоиммунную толерантность тканей организма, предотвращают избыточную активацию иммунной системы и повреждение собственных тканей при воспалительных процессах и оказывают положительные эффекты на избежание возникновения аутоиммунных заболеваний. В условиях патологии они участвуют в иммунитете к опухоли и в

возникновении и развитии различных аутоиммунных заболеваний. В нескольких публикациях сообщается, что PD-L1 экспрессируется на высоком уровне в тканях различных опухолей, и PD-1 экспрессируется на высоком уровне в опухолеинфильтрирующих лимфоцитах. Кроме того, сверхэкспрессия PD-L1 и PD-1 тесно связана с плохим клиническим прогнозом для опухолей (Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(3):307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar; 7(1):1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1):24-33. Immunity. 2013 Jul 25; 39(1):61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10; 33(17):1974-82). Блокирование PD-1/PD-L1 и PD-1/PD-L2 с использованием mAb к PD-1 или блокирование PD-1/PD-L1 и CD80/PD-L1 с использованием mAb к PD-L1 показало удовлетворительные противоопухолевые эффекты как в доклинических, так и в клинических испытаниях. В настоящее время mAb к PD-1 был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США для лечения различных опухолей, в том числе немелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака головы и шеи и т.д., mAb к PD-L1 также было одобрено для лечения немелкоклеточного рака легкого и уротелиального рака. Тем не менее, такая терапия моноклональным антителом может оказывать благоприятное воздействие только на небольшую часть пациентов с опухолью, в то время как большинство пациентов не отвечают на такие моноклональные антитела (Expert Opin Ther Targets. 2014 Dec; 18 (12): 1407-20. Oncology (Williston Park). 2014 Nov; 28 Suppl 3:15-28).

Таким образом, необходимо разработать новое, более активное, бифункциональное антитело, которое одновременно блокирует PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 и CD80/PD-L1 и которое привлекает иммунные клетки к поверхности опухолевых клеток.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к высокостабильному гетеродимерному биспецифичному антителу, которое имеет структурные характеристики натуральных IgG, не имеет несоответствий тяжелой цепи-легкой цепи и может блокировать PD-L1 и PD-1 одновременно, а также относится к способу его получения. Бифункциональное антитело одновременно связывается с PD-L1, экспрессирующимся на опухолевых клетках, и PD-1, экспрессирующимся на иммунных клетках, тем самым вызывая высокоэффективный и специфичный цитолитический эффект и одновременно более низкие токсичные и побочные эффекты.

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к гетеродимерному биспецифичному антителу, содержащему первый антигенсвязывающий функциональный участок, способный к специфичному связыванию с PD-L1, и второй

антигенсвязывающий функциональный участок, способный к специфичному связыванию с PD-1, при этом биспецифичное антитело содержит первую цепь Fc и вторую цепь Fc, связанные одной или несколькими межцепными дисульфидными связями, причем первая цепь Fc и вторая цепь Fc связаны соответственно с антигенсвязывающим функциональным участком для PD-L1 и антигенсвязывающим функциональным участком для PD-1 посредством ковалентной связи или линкера; и первая цепь Fc и вторая цепь Fc содержат 5 аминокислотных замен в следующих положениях:

замены аминокислот в положениях 366 и 399 на первой цепи Fc и замены аминокислот в положениях 351, 407 и 409 на второй цепи Fc,

первая цепь Fc и вторая цепь Fc, содержащие вышеуказанные аминокислотные замены, проявляют тенденцию к образованию гетеродимеров друг с другом, а не к образованию соответствующих гомодимеров, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот в антителе EU по системе Kabat.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные замены в первой цепи Fc и второй цепи Fc являются следующими:

a) замена в положении 351 на глицин, тирозин, валин, пролин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин или триптофан;

b) замена в положении 366 на лейцин, пролин, триптофан или валин;

c) замена в положении 399 на цистеин, аспарагин, изолейцин, глицин, аргинин, треонин или аланин;

d) замена в положении 407 на лейцин, аланин, пролин, фенилаланин, треонин или гистидин;

e) замена в положении 409 на цистеин, пролин, серин, фенилаланин, валин, глутамин или аргинин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные замены являются следующими:

a) замены T366L и D399R на первой цепи Fc, замены L351E, Y407L и K409V на второй цепи Fc;

b) замены T366L и D399C на первой цепи Fc, замены L351G, Y407L и K409C на второй цепи Fc;

c) замены T366L и D399C на первой цепи Fc, замены L351Y, Y407A и K409P на второй цепи Fc;

d) замены T366P и D399N на первой цепи Fc, замены L351V, Y407P и K409S на второй цепи Fc;

e) замены T366W и D399G на первой цепи Fc, замены L351D, Y407P и K409S на второй цепи Fc;

f) замены T366P и D399I на первой цепи Fc, замены L351P, Y407F и K409F на второй цепи Fc;

g) замены T366V и D399T на первой цепи Fc, замены L351K, Y407T и K409Q на второй цепи Fc;

h) замены T366L и D399A на первой цепи Fc, замены L351W, Y407H и K409R на второй цепи Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные замены на первой цепи Fc представляют собой T366L и D399R, аминокислотные замены на второй цепи Fc представляют собой L351E, Y407L и K409V.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цепи Fc получены из IgG.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигенсвязывающие функциональные участки для PD-L1 и PD-1 представляют собой Fab-фрагменты или scFv-фрагменты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления оба антигенсвязывающих функциональных участка для PD-L1 и PD-1 представляют собой Fab-фрагменты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один из антигенсвязывающих функциональных участков для PD-L1 и PD-1 представляет собой Fab-фрагмент, а другой представляет собой scFv.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fab-фрагмент содержит переменный участок первой тяжелой цепи и переменный участок второй тяжелой цепи, которые отличаются, и переменный участок первой легкой цепи и переменный участок второй легкой цепи, которые отличаются.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная последовательность биспецифического антитела является выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему гетеродимерное биспецифическое антитело согласно первому аспекту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность полинуклеотида является выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору экспрессии, содержащему выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор экспрессии представляет собой плазмидный вектор X0GC, полученный с помощью генной инженерии на основе pCDNA.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту или рекомбинантный вектор экспрессии согласно третьему аспекту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин является выбранной из клеток эмбриональной почки человека HEK293 или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток HEK293, таких как HEK293T, HEK293F, HEK293E; клеток яичника хомяка CHO или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток CHO, таких как CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO; *Escherichia coli* или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе *E. coli*, таких как BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami; дрожжей или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе дрожжей, таких как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*; клеток насекомых или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток насекомых, таких как High5, SF9; клеток растений; клеток молочной железы млекопитающего, соматических клеток и подобных.

В соответствии с пятым аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей гетеродимерное биспецифичное антитело согласно первому аспекту, или выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту, или рекомбинантный вектор экспрессии согласно третьему аспекту, или клетку-хозяин согласно четвертому аспекту и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с шестым аспектом настоящее изобретение относится к способу получения гетеродимерного биспецифичного антитела согласно первому аспекту, предусматривающему стадии:

- 1) экспрессии отдельно выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту или рекомбинантного вектора экспрессии согласно третьему аспекту в клетке-хозяине;
- 2) восстановления белков, экспрессирующихся отдельно в клетке-хозяине; и
- 3) смешивания восстановленных белков, а затем окисления смеси.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин является выбранной из клеток эмбриональной почки человека HEK293 или клеток, полученных с

помощью генной инженерии на основе клеток НЕК293, таких как НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е; клеток яичника хомяка CHO или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток CHO, таких как CHO-S, CHO-dhfr^r, CHO/DG44, ExpiCHO; *Escherichia coli* или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе *E. coli*, таких как BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami; дрожжей или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе дрожжей, таких как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*; клеток насекомых или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток насекомых, таких как High5, SF9; клеток растений; клеток молочной железы млекопитающего, соматических клеток и подобных.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления стадия восстановления предусматривает: 1) осуществление реакции восстановления, при этом восстанавливающее средство является выбранным из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбоксиэтил)фосфина, или их химического производного, или их комбинации; 2) удаление восстанавливающего средства.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления стадия окисления представляет собой окисление в воздушной среде, но также предусматривает осуществление реакции окисления в присутствии окисляющего средства, которое является выбранным из группы, состоящей из: L-дегидроаскорбиновой кислоты или других химических производных.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает стадию разделения и очистки.

В соответствии с седьмым аспектом настоящее изобретение относится к применению гетеродимерного биспецифичного антитела согласно первому аспекту, и/или выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту, и/или рекомбинантного вектора экспрессии согласно третьему аспекту, и/или клетки-хозяина согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту в производстве лекарственного препарата для предупреждения и/или лечения заболевания у субъекта.

В соответствии с восьмым аспектом настоящее изобретение относится к гетеродимерному биспецифичному антителу согласно первому аспекту, и/или выделенному полинуклеотиду согласно второму аспекту, и/или рекомбинантному вектору экспрессии согласно третьему аспекту, и/или клетке-хозяину согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту для применения в качестве лекарственного препарата для предупреждения и/или лечения заболевания у субъекта.

В соответствии с девятым аспектом настоящее изобретение относится к способу предупреждения и/или лечения заболевания, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, гетеродимерного биспецифичного антитела согласно первому аспекту, и/или выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту, и/или рекомбинантного вектора экспрессии согласно третьему аспекту, и/или клетки-хозяина согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно, субъекта-человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание представляет собой опухоль, выбранную из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, назофарингеальной карциномы, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, карциномы желчного пузыря, рака печени, рака ободочной и прямой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной карциномы, меланомы.

Авторы настоящего изобретения сконструировали полностью новое гетеродимерное биспецифичное антитело к PD-L1/PD-1 со структурой, подобной натуральному антителу, которое представляет собой высокостабильное гетеродимерное биспецифичное антитело к PD-L1/PD-1, имеющее характеристики натуральных IgG и не имеющее несоответствий тяжелой цепи-легкой цепи. Биспецифичное антитело может одновременно связываться с двумя молекулами-мишенями PD-L1 и PD-1, одновременно блокировать PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 и CD80/PD-L1 и привлекать иммунные клетки к поверхности опухолевых клеток, а также должно проявлять более сильную эффективность при лечении опухолей.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 проиллюстрирован пик элюирования для мономера молекулы гетеродимерного антитела.

На фиг. 2 проиллюстрирован результат анализа мономера молекулы гетеродимерного антитела методом SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия).

На фиг. 3 проиллюстрирована структура молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1.

На фиг. 4 проиллюстрированы схематические структуры молекул полуантитела из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи.

На фиг. 5 проиллюстрированы результаты анализа окисленного продукта в виде молекул полуантитела у антител к PD-L1 и антител к PD-1 методом SDS-PAGE.

На фиг. 6 проиллюстрирован пик элюирования молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1.

На фиг. 7 проиллюстрированы результаты анализа молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 методом SDS-PAGE.

На фиг. 8 проиллюстрированы результаты анализа молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 методом SEC (гель-хроматография).

На фиг. 9 проиллюстрирована активность связывания PD-L1 и активность связывания PD-1 у молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1, при этом на фиг. 9А и фиг. 9В проиллюстрирована активность связывания PD-L1 и активность связывания PD-1, соответственно.

На фиг. 10 проиллюстрировано, что молекула гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 одновременно связывается с клетками SK-BR-3 с высокой экспрессией PD-L1 и с клетками CHO/PD-1 с высокой экспрессией PD-1, при этом фиг. 10А-10D иллюстрируют связывание mAb к PD-L1, mAb к PD-1, mAb к PD-L1+mAb к PD-1 и антителаВНМ к PD-L1/PD-1, соответственно.

На фиг. 11 проиллюстрировано, что молекула гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 стимулирует секрецию цитокинов IL-2 и IFN-гамма.

На фиг. 12 проиллюстрирована цитолитическая активность *in vitro* у молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении опухолевых клеток.

На фиг. 13 проиллюстрирована цитолитическая активность молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении опухолевых клеток в мышинной модели.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

В гетеродимерном биспецифичном антителе «ковалентная связь» относится к ковалентной связи, которая связывает две цепи Fc или любую цепь Fc и соответствующий антигенсвязывающий функциональный участок с образованием молекулы, при этом цепь Fc содержит первый антигенсвязывающий функциональный участок и второй антигенсвязывающий функциональный участок, связанные посредством одной или нескольких ковалентных связей (например, дисульфидных связей); первая цепь Fc и

вторая цепь Fc связаны соответственно с антигенсвязывающим функциональным участком посредством ковалентной связи (такой как иминная связь или амидная связь).

Антигенсвязывающий функциональный участок относится к участку, способному к специфичному взаимодействию с молекулой-мишенью, такой как антиген. Такое взаимодействие является высокоселективным. В целом, последовательность, которая распознает одну молекулу-мишень, не может распознавать последовательности других молекул. Типичный антигенсвязывающий функциональный участок содержит переменный участок антитела, аллостерический переменный участок антитела, рецептор-связывающий участок, лиганд-связывающий участок или фермент-связывающий участок.

Одна или несколько «межцепных дисульфидных связей» относятся к одной или нескольким дисульфидным связям между первой цепью Fc и второй цепью Fc, которые связывают цепи с образованием гетеродимерного фрагмента. В соответствии с настоящим изобретением одна или несколько дисульфидных связей могут образовываться, когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, синтезируются в одной и той же клетке, или они могут быть образованы посредством окислительно-восстановительного процесса *in vitro* после того, как первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, были синтезированы отдельно в разных клетках.

Первая цепь Fc и вторая цепь Fc относятся к объединенному фрагменту, образованному посредством ковалентной связи, при этом ковалентная связь включает в себя дисульфидную связь. Каждая цепь содержит по меньшей мере часть константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина. Более того, первая цепь и вторая цепь отличаются аминокислотными последовательностями, в том числе отличаются по меньшей мере одним положением аминокислоты. В первой цепи Fc и второй цепи Fc согласно настоящему изобретению существует сильное отталкивание между одинаковыми цепями, в то время как между отличающимися цепями существует притяжение. Таким образом, первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, проявляют тенденцию к образованию гетеродимера, когда они коэкспрессируются в клетке. Когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, экспрессируются отдельно в двух клетках-хозяевах, первые цепи Fc или первая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок, связанный с ней, не проявляют

тенденцию к образованию гомодимера, и вторые цепи Fc или вторая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок, связанный с ней, не проявляют тенденцию к образованию гомодимера. В соответствии с настоящим изобретением, если первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, экспрессируются отдельно в двух клетках-хозяевах в присутствии восстанавливающего средства, доля гомодимера составляет менее 50%. То есть доля мономеров (цепь Fc или цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок, связанный с ней) составляет более 50%.

Иммуноглобулин имеет симметричную структуру из четырех полипептидных цепей, включающую в себя две идентичные тяжелые цепи, которые являются более длинными и имеют большую относительную молекулярную массу, содержат 450-550 аминокислотных остатков и имеют относительную молекулярную массу, составляющую от 55000 Да до 70000 Да; две идентичные легкие цепи (L-цепи), которые являются более короткими и имеют меньшую относительную молекулярную массу, содержат приблизительно 210 аминокислотных остатков и имеют относительную молекулярную массу, составляющую приблизительно 24000 Да. Последовательности приблизительно из 110 аминокислот вблизи N-конца являются очень вариабельными в тяжелых и легких цепях различных иммуноглобулинов и известны как вариабельный участок (V-участок). Остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и известны как константный участок (C-участок). В тяжелых цепях на вариабельный участок приходится приблизительно 1/4 длины тяжелой цепи, в то время как на константный участок приходится приблизительно 3/4 длины тяжелой цепи. Что касается известных пяти изотипов Ig, *т.е.* IgG(γ), IgA(α), IgD(δ), IgM(μ) и IgE(ϵ), существует три константных участка в H-цепях первых трех изотипов Ig, *т.е.* CH1, CH2 и CH3. В H-цепях последних двух изотипов (IgM и IgE) существует один VH участок и четыре константных участка, *т.е.* CH1-CH4. Константный участок представляет собой каркас молекул иммуноглобулинов, а также один из участков, активирующих иммунные реакции.

В соответствии с настоящим изобретением часть константного участка включает в себя по меньшей мере взаимодействующие участки первой цепи Fc и второй цепи Fc. В случае IgG участки представляют собой некоторые аминокислоты в CH3 участках, в том числе по меньшей мере GLN347, TYR349, THR350, LEU351, SER354, ARG355, ASP356, GLU357, LYS360, SER364, THR366, LEU368, LYS370, ASN390, LYS392, THR394, PRO395, VAL397, ASP399, SER400, PHE405, TYR407, LYS409, LYS439.

Связь первой цепи Fc и второй цепи Fc посредством ковалентной связи или линкера, соответственно, с «одним антигенсвязывающим функциональным участком» относится к тому, что первая цепь Fc и вторая цепь Fc связаны посредством ковалентной связи или линкера, соответственно, с антигенсвязывающим фрагментом антитела или одноцепочечным антителом, способным к распознаванию антигена, или другими аллостерическими фрагментами антитела, способными к распознаванию антигена, или рецептором, способным к распознаванию лиганда, или лиганда, способного к распознаванию рецептора. Ковалентная связь является разновидностью химической связи, в которой два или больше атомов совместно используют свои электроны внешней оболочки, в идеальном случае достигая состояния электронного насыщения, таким образом формируя относительно стабильную химическую структуру, называемую ковалентной связью. Иными словами, ковалентная связь представляет собой взаимодействие, образующееся между атомами при обобществлении электронных пар. Посредством ковалентных связей могут связываться как атомы одинакового элемента, так и разных элементов. Ковалентная связь между первой цепью Fc и второй цепью Fc согласно настоящему изобретению включает в себя, без ограничения, амидную связь, образованную при реакции дегидратации между аминокруппами одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группой другой молекулы аминокислоты, или амидную связь или иминную связь, образованную из альдегидной группы этиленгликоля, или полиэтиленгликоля, или других соединений, или их полимера и аминокруппы одной молекулы аминокислоты. Линкер представляет собой сегмент аминокислотной последовательности, или соединение, или полимер соединения, которое может связывать две полипептидные цепи посредством ковалентных связей. Сегмент аминокислотной последовательности включает в себя, без ограничения, небольшие пептидные сегменты, такие как GGGSGGGSGGGGS. Первая цепь Fc или вторая цепь Fc и одноцепочечное антитело, способное к распознаванию антигена, или другие аллостерические фрагменты антитела, способные к распознаванию антигена, могут быть связаны посредством амидной связи.

Контекст, относящийся к фразе «первая цепь Fc и вторая цепь Fc проявляют тенденцию к образованию гетеродимеров, а не к образованию соответствующих гомодимеров», относится к тому, что в случае первой цепи Fc и второй цепи Fc вследствие отталкивания, существующего между одинаковыми цепями, и притяжения, существующего между отличающимися цепями, первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, проявляют тенденцию к образованию гетеродимера, когда они

коэкспрессируются в клетке. Когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc или первая цепь Fc и вторая цепь Fc, а также антигенсвязывающие функциональные участки, связанные с ними, экспрессируются отдельно в двух клетках-хозяевах, первые цепи Fc или первая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок, связанный с ней, не проявляют тенденцию к образованию гомодимера, и вторые цепи Fc или вторая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок, связанный с ней, не проявляют тенденцию к образованию гомодимера.

Система нумерации по Kabat относится к способу, примененному Kabat для присвоения номера каждой аминокислоте в последовательности антитела, который стал стандартным способом в данной области техники. Схему нумерации по Kabat можно распространять на другие антитела за пределами его исследований. На основании консервативных аминокислот целевое антитело выравнивают с одной из консенсусных последовательностей, идентифицированных Kabat.

«Fc-домен» относится к фрагменту кристаллизуемого участка (Fc), соответствующему CH2 и CH3 доменам Ig, который представляет собой часть для взаимодействия Ig с эффекторной молекулой или клеткой.

IgG, сокращение для иммуноглобулина G (IgG), является основным представляющим собой антитело компонентом в сыворотке крови. Человеческий IgG делится на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, на основании антигенных различий в г цепях молекул IgG.

Молекула «полуантитела» относится к структуре, образованной одной тяжелой цепью и одной легкой цепью антитела, в которой тяжелая цепь и легкая цепь могут быть связаны или не связаны посредством ковалентной связи. Оно представляет собой структуру моновалентного антитела, которая распознает антиген.

«Fab-фрагмент», *т.е.* фрагмент, связывающий антиген, (Fab) представляет собой распознающую молекулу последовательность, соответствующую двум плечам молекулы антитела, которая состоит из интактной легкой цепи и VH и CH1 доменов тяжелой цепи. «scFv» представляет собой последовательность, распознающую молекулу, и представляет собой модифицированный фрагмент антитела, полученный с помощью методов генной инженерии переменного участка легкой цепи и переменного участка тяжелой цепи антитела. «Внеклеточный участок» мембранного рецептора представляет собой последовательность, распознающую молекулу. Мембранный рецептор обычно включает в себя внеклеточный участок, который располагается за пределами клетки и распознает и связывается с соответствующим антигеном или лигандом, трансмембранный участок, который заякоривает рецептор на поверхности клетки, и внутриклеточный участок внутри

клетки, который имеет активность внутриклеточной киназы или может передавать сигнал по путям передачи сигнала. «Лиганд» рецептора клеточной мембраны относится к белку, небольшому пептиду или соединению, которое может распознаваться и связываться с внеклеточным участком мембранного рецептора. Цитокины представляют собой растворимые белки с низкой молекулярной массой, которые продуцируются различными типами клеток, индуцируемых иммуногенами, митогенами или другими стимулирующими средствами, и имеют различные функции, такие как регуляция врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета, гемопоэза, клеточного роста, взрослых плюрипотентных стволовых клеток (APSC) и восстановления поврежденных тканей и т.д. Цитокины делят на классы интерлейкинов, интерферонов, суперсемейство факторов некроза опухолей, колониестимулирующих факторов, хемокинов, ростовых факторов и т.д. «Метка для экспрессии белка» относится к сегменту аминокислотной последовательности, либо небольшому пептиду, либо отрезку из аминокислот, который добавляют к N-концу или C-концу целевого белка. Добавление меток может быть преимущественным для правильного фолдинга белков, выделения и очистки белков и снижения внутриклеточного разрушения белков. Обычно применяемые метки включают в себя, без ограничения, HA, SUMO, His, GST, GFP и Flag.

Не существует ограничения для антител, применимых для гетеродимерного биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, в настоящем изобретении можно применять любые антитела, известные в уровне техники для лечения и/или предупреждения заболеваний.

Гетеродимерное биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению может иметь одну или несколько замен, делеций, добавлений и/или вставок. Например, некоторые аминокислоты могут заменять другие аминокислоты в структуре белка без значительной потери способности к связыванию с другими полипептидами (такими как антигены) или клетками. Поскольку биологическая функциональная активность белка определяется способностью к связыванию и свойствами белка, последовательность белка можно подвергнуть замене некоторых аминокислотных последовательностей без значительной потери его биологической эффекторной активности.

Во многих случаях варианты полипептида содержат одну или несколько консервативных замен. «Консервативная замена» относится к замене аминокислоты на другие аминокислоты, имеющие подобные свойства, в результате чего специалист в области химии пептидов будет ожидать, что вторичная структура и гидрофильные свойства полинуклеотида будут, по существу, неизменными.

Аминокислотные замены обычно основываются на относительном сходстве заместителей на боковых цепях аминокислот, как например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.д. Принимая во внимание различные характеристики, описанные выше, иллюстративные замены хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники и включают в себя: аргинин и лизин; глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту; серин и треонин; глутамин и аспарагин; а также валин, лейцин и изолейцин.

Термин «идентичность» в контексте настоящего изобретения имеет значение, общеизвестное в данной области техники, и относится к проценту идентичных остатков у варианта последовательности полинуклеотида или полипептида и последовательности, не являющейся вариантом при выравнивании последовательностей и введении гэпов (если это необходимо для достижения максимальной % гомологии). Правила и критерии для определения идентичности между различными последовательностями также являются известными квалифицированному специалисту в данной области техники. В соответствии с настоящим изобретением, если определение идентичности удовлетворено, оно также требует, чтобы полученный вариант последовательности характеризовался биологической активностью, которой обладает исходная последовательность. Способы и средства для скрининга вариантов последовательностей с вышеуказанной активностью являются хорошо известными квалифицированному специалисту в данной области техники. На основании информации, раскрытой в данном документе, специалист в данной области техники легко получит такие варианты последовательностей. В соответствии с конкретным вариантом осуществления варианты полинуклеотида и полипептида характеризуются по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичностью полинуклеотидов или полипептидов с полинуклеотидом или полипептидом, описанным в данном документе. Вследствие избыточности генетического кода существуют варианты, кодирующие одинаковую аминокислотную последовательность из этих этих последовательностей.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения предполагается композиция с полинуклеотидом, способным к гибридизации с последовательностью полинуклеотида, обеспечиваемого согласно настоящему изобретению, или ее фрагментом, или ее комплементарной последовательностью в условиях умеренной-высокой жесткости. Методики гибридизации являются хорошо

известными в области молекулярной биологии. В качестве иллюстрации, подходящие условия умеренной жесткости для исследования гибридизации полинуклеотида согласно настоящему изобретению с другими полинуклеотидами включают в себя предварительную отмывку раствором $5\times\text{SSC}$, 0,5% SDS, 1,0 мМ EDTA (pH 8,0); гибридизацию в условиях $5\times\text{SSC}$ при 50°C - 60°C в течение ночи; и отмывку при 65°C с использованием $2\times$, $0,5\times$ и $0,2\times\text{SSC}$, содержащих 0,1% SDS, два раза в течение 20 минут. Специалист в данной области техники понимает, что жесткостью гибридизации можно легко управлять, например, изменяя содержание соли в гибридизационном растворе и/или температуру гибридизации. Например, в соответствии с другим вариантом осуществления подходящие условия гибридизации высокой жесткости включают в себя условия, описанные выше, за исключением повышения температуры гибридизации, например, до 60 - 65°C или 65 - 70°C .

Клетка-хозяин согласно настоящему изобретению может представлять собой любую клетку, применяемую для экспрессии гетерологичных генов, в том числе, без ограничения, *E. coli*, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих.

Вектор согласно настоящему изобретению включает в себя вектор, который может реплицироваться в любом типе клеток или организмов, в том числе, без ограничения, например, плазмиды, бактериофаги, космиды и минихромосомы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор, содержащий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, представляет собой вектор, подходящий для воспроизводства или репликации полинуклеотида, или вектор, подходящий для экспрессии полинуклеотида согласно настоящему изобретению. Такой вектор является известным в уровне техники и коммерчески доступным.

«Векторы» включают в себя челночные векторы и векторы экспрессии. Обычно плазмидная конструкция также включает в себя точку начала репликации (например, точку начала репликации *ColE1*) и селективируемый маркер (например, ген устойчивости к ампициллину или тетрациклину), применяемые, соответственно, для репликации и селекции плазмиды в бактериях. «Вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему управляющую последовательность или регуляторный элемент, требующиеся для экспрессии антитела согласно настоящему изобретению, в том числе фрагментов антитела, в бактериях или эукариотических клетках.

Вектор согласно настоящему изобретению может представлять собой любой вектор, применяемый для экспрессии гетерологичных генов, в том числе, без ограничения, плазмидный вектор, при этом плазмидный вектор содержит по меньшей мере точку начала репликации, промотор, ген, представляющий интерес, сайт множественного клонирования и ген селективируемого маркера. Предпочтительно, вектор согласно настоящему

изобретению включает в себя, без ограничения, плазмидный вектор, полученный посредством модификации из pcDNA, такой как вектор X0GC.

Субъект согласно настоящему изобретению включает в себя домашнюю птицу, рептилий, млекопитающих и т.д. Предпочтительно, млекопитающие включают в себя грызунов и приматов. Предпочтительно, приматы включают в себя людей.

Вид заболеваний, рассматриваемых в настоящем изобретении, включает в себя, без ограничения, опухоли. Предпочтительно, опухоли включают в себя: лейкоз, лимфому, миелому, опухоль головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, назофарингеальную карциному, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, карциному желчного пузыря, рак печени, рак ободочной и прямой кишки, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак эндометрия, саркому матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, меланому.

Фармацевтически приемлемый носитель относится к фармацевтическому носителю, который обычно применяют в области фармацевтики, например, к разбавителям, вспомогательным средствам, воде и т.д.; наполнителям, таким как крахмал, сахароза, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза и т.д.; связующим средствам, таким как производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; смачивающим средствам, таким как глицерин; разрыхлителям, таким как карбоксиметилкрахмал натрия, гидроксипропилцеллюлоза, сшитая карбоксиметилцеллюлоза, агар, карбонат кальция, бикарбонат натрия; усилителям абсорбции, таким как соединения четвертичного аммония; поверхностно активным веществам, таким как гексадеканол, лаурилсульфат натрия; абсорбирующим носителям, таким как каолинит, бентонит; смазывающим средствам, таким как тальк, стеарат кальция и стеарат магния, тонкоизмельченный силикагель и полиэтиленгликоль и т.д. Кроме того, в композицию могут быть добавлены другие вспомогательные средства, такие как ароматизатор и подсластитель.

Настоящее изобретение будет дополнительно объяснено ниже со ссылкой на следующие неограничивающие примеры. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что различные модификации могут быть выполнены в настоящем изобретении без отступления от идеи настоящего изобретения. Такие модификации также попадают в пределы объема настоящего изобретения.

Все следующие экспериментальные методы являются общепринятыми методами, если не определено иное. Используемые экспериментальные материалы можно легко получить от коммерческих компаний, если не определено иное. Все антитела, применяемые в следующих примерах согласно настоящему изобретению, представляют

собой стандартные антитела, которые являются полученными из коммерческих источников.

Пример 1. Конструирование вектора для молекулы гетеродимерного антитела

Конструировали векторы экспрессии X0GC, содержащие соответственно тяжелую цепь и легкую цепь антитела к PD-L1, в которых последовательности переменных участков антитела были получены из <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11595>. Константный участок тяжелой цепи был получен из IgG1 человека. Нуклеотидная последовательность переменного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 1, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 2; нуклеотидная последовательность константного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 3, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность переменного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 5, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 6; нуклеотидная последовательность константного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 7, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 8. Переменный участок легкой цепи и константный участок легкой цепи, переменный участок тяжелой цепи и константный участок тяжелой цепи амплифицировали с помощью ПЦР, соответственно. ДНК-полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (F-530L; от NEB, Inc.) использовали во всех ПЦР реакциях, описываемых в данной заявке. ПЦР праймеры традиционно конструировали в соответствии с принципом спаривания комплементарных оснований и требованием наличия сайтов расщепления ферментом. Все реакционные системы представляли собой: 8,9 мкл H₂O, 4 мкл 5× буфера для ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 4 мкл 1 mM dNTP, 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера, 0,1 мкл ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase и 1 мкл матрицы. ПЦР продукты переменных участков и константных участков подвергали электрофорезу в геле с 1,5% агарозы и соответствующие фрагменты выделяли с применением набора для выделения ДНК (Promega, A9282, такой же использовался далее). Дополнительную ПЦР осуществляли с использованием выделенного фрагмента с переменным участком и фрагмента с константным участком в качестве матриц с применением прямого праймера для переменного участка и обратного праймера для константного участка. Затем соответствующие фрагменты выделяли с получением полноразмерного фрагмента легкой цепи или тяжелой цепи. Вектор X0GC и полноразмерные фрагменты расщепляли EcoRI (NEB; № в каталоге R3101L) и HindIII (NEB; № в каталоге R3104L). Реакционная система для расщепления ферментами

представляла собой: 2 мкл 10× буфера 3, 0,5 мкл каждого из EcoRI и HindIII, 3 мкл полноразмерных фрагментов, выделенных из геля, и 14,5 мкл H₂O. Обеспечивали возможность протекания реакции в системе для расщепления ферментами при 37°C в течение 3 часов. Продукты расщепления ферментами лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 (NEB; № в каталоге M0202V) (такая же использовалась далее). Реакционная система представляла собой: 2 мкл 10× буфера для лигазы, 0,5 мкл лигазы, 3 мкл полноразмерных фрагментов, выделенных из геля, 3 мкл вектора X0GC, выделенного из геля, и 11,5 мкл H₂O. Лигирование осуществляли при комнатной температуре в течение 12 часов. Лигированные продукты трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5α (Tiangen, CB104, такие же использовались далее) с получением соответствующих векторов экспрессии X0GC для тяжелой цепи и легкой цепи антитела для экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи антитела в эукариотических клетках, соответственно.

Конструировали векторы экспрессии X0GC для тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 (Pem), соответственно, в которых последовательности переменных участков антитела были взяты из <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9798>. Нуклеотидная последовательность переменного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 9, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 10; нуклеотидная последовательность константного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 3, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность переменного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 11, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 12; нуклеотидная последовательность константного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 13, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 14. Соответствующие векторы экспрессии X0GC для тяжелой цепи и легкой цепи антитела получали для экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи антитела в эукариотических клетках, соответственно.

Согласно настоящему изобретению также конструировали векторы экспрессии X0GC для тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 (BJHM). Нуклеотидная последовательность переменного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 15, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 16; нуклеотидная последовательность константного участка легкой цепи показана в виде SEQ ID NO: 3, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность переменного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 17, его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 18; нуклеотидная последовательность константного участка тяжелой цепи показана в виде SEQ ID NO: 13,

его аминокислотная последовательность показана в виде SEQ ID NO: 14. Соответствующие векторы экспрессии X0GC для тяжелой цепи и легкой цепи антитела получали для экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи антитела в эукариотических клетках, соответственно.

Пример 2. Экспрессия молекулы гетеродимерного антитела

Соответствующие векторы экспрессии для тяжелой цепи и легкой цепи антитела совместно трансфицировали в клетки линии 293F (FreeStyle™ 293-F Cells, кат. № R79007, Invitrogen). За одни сутки до трансфекции клетки инокулировали. В день трансфекции клетки собирали посредством центрифугирования, а затем ресуспендировали в свежей среде для экспрессии FreeStyle™ 293 (кат. № 12338001; Gibco) с плотностью клеток 200×10^5 клеток/мл. Плазмиды добавляли в соответствии с трансфицируемым объемом в конечной концентрации 36,67 мкг/мл и аккуратно смешивали. Затем линейный PEI (полиэтиленимин, линейный, молекулярная масса 25000, кат. № 43896, Alfa Aesar) добавляли до конечной концентрации 55 мкг/мл и аккуратно смешивали. После этого смесь помещали в инкубатор для клеток и инкубировали в шейкере при 120 об./мин. и 37°C в течение 1 часа. Затем добавляли свежую среду в объеме, в 19 раз превышающем трансфицируемый объем. Инкубирование продолжали в шейкере при 120 об./мин., 37°C. Супернатанты культуры клеток, трансфицированных в течение 5-6 суток, собирали посредством центрифугирования.

Величины экспрессии определяли с помощью метода ELISA. Перед очисткой с применением хроматографической колонки осадки удаляли посредством фильтрования через мембранный фильтр с размером ячеек 0,2 мкм. Эту стадию осуществляли при 4°C.

Пример 3. Очистка продукта экспрессии молекулы гетеродимерного антитела

Очистку осуществляли при 4°C с применением системы для очистки белка АКТА Explorer 100 Protein Purification System (GE Healthcare) и колонки для аффинной хроматографии с белком А на сефарозе rProtein A Sepharose Fast Flow affinity chromatographic column (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare). Вначале хроматографическую колонку уравнивали подвижной фазой А (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,4). После того как фоновый уровень стабилизировался, клеточный супернатант, обработанный, как указано выше, загружали со скоростью потока 5 мл/мин. После процесса загрузки подвижную фазу А использовали для уравнивания. После этого, 5 объемов колонки подвижной фазы В1 (подвижная фаза А плюс 0,5 М аргинин) использовали для промывания колонки; и 5 объемов колонки

подвижной фазы В2 (100 мМ лимонная кислота, рН 3,0) использовали для элюирования, чтобы получить элюируемый пик, т.е. пик для белка, представляющего интерес. Скорость потока на всех вышеуказанных стадиях элюирования составляла 5 мл/мин. Хроматограмма элюируемого пика для продукта экспрессии антитела к PD-L1 проиллюстрирована на фиг. 1. Элюируемый пик для продукта экспрессии антитела к PD-1 является аналогичным (результат не включен). Указанный элюируемый пик (показанный в виде области, выделенной серым цветом) регистрировали и рН корректировали до рН 5,0 посредством капельного добавления 1 М раствора ацетата натрия.

Очищенные продукты анализировали с помощью метода SDS-PAGE, и результаты показаны на фиг. 2.

Пример 4. Получение и очистка молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1

Структура молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 проиллюстрирована на фиг. 3.

Молекула полуантитела для антитела, полученного в вышеуказанном способе rProtein A Sepharose Fast Flow (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare), подвергали повторной сборке *in vitro* с получением гетеродимера. Раствор белка, очищенный и собранный, как указано выше, вначале концентрировали с помощью ультрафильтрации с применением концентрирующей пробирки для ультрафильтрации (номинальное отсекающее значение по молекулярной массе составляет 10 кДа), а затем раствор замещали фосфатно-буферным солевым раствором (PBS) (рН=7,4). Полученные молекулярные растворы с молекулами полуантитела для антител к PD-L1 и к PD-1 доводили до концентрации 1 мг/мл посредством добавления PBS, соответственно. 1 М DTT добавляли в объеме, составляющем 1/200 от конечного объема, в результате чего конечная концентрация DTT составляла 5 мМ, соответственно. Восстановление осуществляли при 4°C (от 3 до 8 часов) для разрыва дисульфидных связей. Дисульфидные связи в шарнирном участке молекул гомодимерного антитела, содержащиеся в небольшом количестве в молекулах полуантитела к PD-1, также разрушались, таким образом образуя молекулы полуантитела, содержащие одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, в виде структур, проиллюстрированных на фиг. 4. Восстановленный образец анализировали с помощью SEC-HPLC. Доля молекулы полуантитела составляла более 90%.

После этого восстановленные молекулы полуантител к PD-L1 и к PD-1 смешивали в эквимолярном соотношении и подвергали реакции повторной сборки при 4°C в течение 24 часов. В ходе повторной сборки гетеродимерное биспецифичное антитело, содержащее

молекулы полуантител как к PD-L1, так и к PD-1, образовывалось из молекул полуантител к PD-L1 и к PD-1 посредством нековалентного взаимодействия между CH₂/CH₃. Затем растворы белков концентрировали с помощью ультрафильтрации с применением концентрирующей пробирки для ультрафильтрации (номинальное отсекающее значение по молекулярной массе составляет 10 кДа). Раствор замещали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (pH=7,4) для прекращения восстановления. Окисление осуществляли в воздушной среде или с использованием окисляющего средства, чтобы обеспечить возможность повторного образования дисульфидных связей в гетеродимерном биспецифичном антителе. Условия окисления были следующими: добавление 100 мМ L-дегидроаскорбиновой кислоты в качестве окисляющего средства; конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл, и конечная концентрация окисляющего средства составляла 1 мМ; реакцию окисления осуществляли при 4°C в течение 24 часов. Образец, полученный с помощью вышеописанной реакции окисления, подвергали анализу методом SDS-PAGE. Результаты представлены на фиг. 5.

Молекула гетеродимера, полученного посредством вышеуказанного восстановления-окисления вышеуказанных молекул полуантител к PD-L1 и к PD-1, концентрировали с помощью ультрафильтрации с применением концентрирующей пробирки для ультрафильтрации (номинальное отсекающее значение по молекулярной массе составляет 10 кДа). Раствор замещали 10 мМ натрий-фосфатным буфером (pH=5,8). Очистку осуществляли при 4°C с применением системы для очистки белка АКТА Explorer 100 Protein Purification System (GE Healthcare) и колонки для ионообменной хроматографии Source 15S (внутренний диаметр 16 мм, 17 мл, GE Healthcare). Вначале хроматографическую колонку уравнивали подвижной фазой А (10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0). После того как фоновый уровень стабилизировался, раствор белка, обработанный как указано выше, загружали со скоростью потока 3 мл/мин. После процесса загрузки подвижную фазу А использовали для уравнивания. После этого колонку элюировали 20 объемами колонки с градиентом изменения от А (10 мМ фосфат натрия, pH 5,8) к В (10 мМ фосфат натрия, pH 5,8) (0% В-100% В, 170 мин., скорость потока 2 мл./мин.). Указанный основной элюируемый пик регистрировали (представлен на фиг. 6), и собранный раствор белка концентрировали с помощью ультрафильтрации с применением концентрирующей пробирки для ультрафильтрации (номинальное отсекающее значение по молекулярной массе составляет 10 кДа). Раствор замещали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH=7,4), стерилизовали фильтрованием и хранили при 4°C. Очищенный продукт анализировали с помощью метода SDS-PAGE. Результаты представлены на фиг. 7.

После анализа частоты с помощью SEC-HPLC частота составляла 96,44% согласно результатам, показанным на фиг. 8.

Пример 5. Активность связывания *in vitro* с мишенью у молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1

Активность связывания гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 с одним антигеном определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Подробно излагаемый процесс анализа является следующим: рекомбинантный человеческий PD-L1 (Beijing Sino Biological Inc., кат. № 10377-H08H) или человеческий PD-1 (Beijing Sino Biological Inc., кат. № 10377-H08H) наносили в виде покрытия на 96-луночный планшет для ELISA с высокой абсорбцией с использованием карбонатного буфера с pH 9,6 в концентрации для нанесения покрытия 1 мкг/мл в объеме 100 мкл на лунку. Нанесение покрытия осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз. Затем планшет блокировали с использованием 300 мкл/лунка PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали в течение 1 часа при 25°C, а затем пять раз промывали PBST. Образцы гетеродимерного антитела и контроль, которые подвергали серийному разведению PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл/лунка и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали PBST пять раз. Затем меченое пероксидазой хрена человеческое антитело IgG (Chemicon, кат. № AP309P), разведенное в соотношении 1:2000 PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл/лунка и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали PBST пять раз. Колориметрический субстрат ТМВ добавляли в количестве 100 мкл/лунка и проявляли в течение 10 минут при комнатной температуре. Проявление цвета завершали посредством добавления 1 М H₂SO₄ в количестве 100 мкл/лунка. Значения спектральной поглощательной способности при 450 нм считывали на микропланшет-ридере.

В соответствии с результатами, представленными на фиг. 9, как антител_{рем} к PD-L1/PD-1, так и антител_{вжм} к PD-L1/PD-1 характеризуются высокой аффинностью в отношении PD-L1 и PD-1; активность аффинности к антигену у бивалентного моноклонального антитела хорошо сохранялась. В вышеуказанном анализе антител_{вжм} к PD-L1/PD-1 имело более высокую аффинность к PD-1, чем антител_{рем} к PD-L1/PD-1.

Пример 6. Активность молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении индукции ассоциации клеток посредством одновременного связывания с двумя мишенями

Активность гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении индукции ассоциации клеток посредством одновременного связывания с двумя мишенями определяли на клетках HCC827, экспрессирующих PD-L1, и клетках CHO/PD-1 с высокой экспрессией PD-1 (GenScript, кат. № M00529) с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS).

Клетки CHO/PD-1 окрашивали в соответствии с инструкциями к набору PKH26 (Sigma, кат. № SLBH4568V). Вкратце, клетки CHO/PD-1 собирали, однократно промывали бессывороточной средой и суспендировали в количестве 2×10^7 /мл в разбавителе C (Diluent C) в наборе PKH26. Краситель PKH26 разводили до 4 мкМ разбавителем C и смешивали с суспензией клеток в соотношении 1:1. Смешанную суспензию, имеющую плотность клеток 1×10^7 /мл и концентрацию PKH26 2 мкМ, инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре, а затем инкубировали с равным объемом FBS в течение 1 минуты для завершения окрашивания. Суспензию центрифугировали при 400 g в течение 10 минут, промывали дважды полной средой и ресуспендировали в полной среде для дальнейшего использования. Клетки HCC827 окрашивали в соответствии с инструкциями к набору CFSE (Life technology, кат. № C34554). Вкратце, CFSE разводили PBS до рабочей концентрации, составляющей 0,5 мкМ, и предварительно подогревали до 37°C. Клетки HCC827 собирали посредством центрифугирования при 1000 об./мин. в течение 5 минут, а затем суспендировали с предварительно подогретым рабочим раствором CFSE и инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Клетки собирали посредством центрифугирования при 1000 об./мин. в течение 5 минут, ресуспендировали в полной среде и инкубировали в течение 30 минут. Затем клетки промывали один раз полной средой, а затем ресуспендировали в полной среде для дальнейшего использования.

Вышеуказанные окрашенные клетки собирали посредством центрифугирования и промывали один раз холодным PBS, содержащим 2% FBS. Клетки ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 2% FBS, с плотностью клеток, составляющей 5×10^6 /мл. Клетки HCC827 и CHO/PD-1 смешивали в соотношении 1:1. 100 мкл смеси клеток помещали в каждую проточную пробирку (т.е. $2,5 \times 10^5$ HCC827 и $2,5 \times 10^5$ CHO/PD-1), а затем добавляли 100 мкл образца гетеродимерного антитела, разводили холодным PBS, содержащим 2% FBS, контроль или изотипический контроль (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi WoYa Biopharmaceutical Co., Ltd., Национальное разрешение на применение лекарственного препарата № S19993012). Проточные пробирки инкубировали на льду в течение 30 минут,

промывали два раза PBS, содержащим 2% FBS, а затем ресуспендировали в 500 мкл холодного PBS. Суспензию клеток детектировали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты представлены в таблице 1 и на фиг. 10. При одновременном связывании с клетками HCC827, экспрессирующими PD-L1, и клетками CHO/PD-1 с высокой экспрессией PD-1 с гетеродимерным антителом гетеродимерное антитело к PD-L1/PD-1 может индуцировать тесную ассоциацию между клетками HCC827 и CHO/PD-1, которая является основой для опосредования цитолиза опухолевых клеток Т-клетками.

Таблица 1. Процент клеток, индуцированных в тесной ассоциации

Образцы	% ассоциированных клеток
Изотипический контроль	2,23
mAb к PD-L1 (10 нМ)	1,96
mAb _{рем} к PD-1 (10 нМ)	2,45
mAb _{ВНМ} к PD-1 (10 нМ)	2,21
mAb к PD-L1 (10 нМ)+mAb к PD-1 (10 нМ)	2,38
Антитело _{рем} к PD-L1/PD-1 (10 нМ)	26,22
Антителo _{ВНМ} к PD-L1/PD-1 (0,1 нМ)	4,69
Антителo _{ВНМ} к PD-L1/PD-1 (1 нМ)	25,05
Антителo _{ВНМ} к PD-L1/PD-1 (10 нМ)	26,01

Пример 7. Регуляторная активность молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении Т-клеток

Регуляторную активность гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении Т-клеточного иммунного ответа определяли с помощью реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Получение человеческих дендритных клеток (DC): функциональную активность клеток PBMC человека (Lonza, кат. № CC-2702) восстанавливали и клетки собирали. Клетки PBMC человека ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 с плотностью клеток, составляющей 5×10^6 /мл, инокулировали в матрас для культивирования клеток и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 90 минут. После удаления культурального супернатанта и суспендирования клеток прикрепившиеся клетки культивировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS), к ним добавляли 100 нг/мл GM-CSF (Beijing Sino Biological Inc., кат. № 10015-HNAH) и 100 нг/мл IL-4 (Beijing Sino Biological Inc., кат. № 11846-HNAE). После инкубирования в течение 3 суток

среду заменяли и клетки инкубировали в течение еще 3 суток. Затем среду культивирования заменяли на полную среду (RPMI 1640, содержащая 10% FBS), содержащую 100 нг/мл GM-CSF, 100 нг/мл IL-4 и 20 нг/мл TNF- α , и клетки инкубировали в течение 1 суток с получением DC клеток.

Получение человеческих Т-клеток: функциональную активность клеток РВМС человека восстанавливали и клетки собирали, обеспечивая, чтобы эти клетки РВМС и РВМС для индукции DC клеток были получены от разных индивидов. Человеческие Т-клетки выделяли в соответствии с инструкциями в наборе для выделения пан-Т-клеток Pan T Cell Separation kit (Miltenyi Biotech, кат. № 5150414820). Вкратце, РВМС промывали один раз PBS и ресуспендировали в количестве 10^7 клеток (все количества далее рассчитывали на 10^7 клеток) на 40 мкл буфера для выделения (PBS, содержащий 2 mM EDTA, 0,5% BSA, pH=7,2). 10 мкл коктейля меченых биотином антител к пан-Т-клеточным антигенам добавляли и инкубировали при 4°C в течение 5 минут. После этого 30 мкл буфера для разделения и 20 мкл коктейля микрогранул для выявления пан-Т-клеток добавляли и инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Т-клетки получали с применением колонки для разделения методом MACS.

Собранные человеческие DC клетки и человеческие Т-клетки ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащая 10% FBS) и инокулировали на 96-луночный планшет в количестве 1×10^4 /лунка и 1×10^5 /лунка, соответственно, и культивировали в смеси. Образцы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 подвергали серийному разведению в полной среде и добавляли контроль. Планшет для культивирования помещали в CO₂ инкубатор для инкубирования при 37°C в течение 5 суток. По завершению инкубирования супернатант в лунках отбирали и цитокины IL-2 (Ray Biotech, кат. № ELH-IL2) и IFN- γ (Ray Biotech, кат. № ELH-IFNg) выявляли в соответствии с инструкциями к набору.

Как показано на фиг. 11, человеческие Т-клетки, стимулируемые аллогенными DC клетками, могут активировать и секретировать IL-2 и IFN- γ . Добавление антитела к PD-L1 или антитела к PD-1 может усиливать активацию Т-клеток и стимулировать секрецию цитокинов. Гетеродимерное антитело к PD-L1/PD-1 характеризуется более сильной регуляторной активностью в отношении Т-клеток, чем моноклональное антитело, и более значительно стимулирует секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ .

Пример 8. Цитолитическая активность молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в отношении опухолевых клеток *in vitro*

Собирали опухолевые клетки HCC827. Клетки HCC827 ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) с плотностью клеток, составляющей 5×10^4 /мл, и инокулировали в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл на лунку (5×10^3 клеток в каждую лунку). Планшет инкубировали в течение 3-4 часов в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 3-4 часов. Функциональную активность клеток PBMC человека (Lonza, кат. № CC-2702) восстанавливали и клетки собирали. PBMC ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащая 10% FBS) с плотностью клеток, составляющей 2×10^6 /мл, и добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунка (1×10^5 клеток на лунку) таким образом, чтобы соотношение эффекторных клеток к целевым клеткам составляло 20:1. Гетеродимерное антитело к Троп-2/CD3 (Beijing Hanmei Pharm.) добавляли в конечной концентрации 1 нМ. Образцы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 подвергали серийному разведению в полной среде и добавляли контроль. Общий объем жидкостей в каждой лунке составлял 200 мкл. Инкубируемый планшет помещали в CO₂-инкубатор для инкубирования при 37°C в течение 3 суток. В конце инкубирования культуральный супернатант и суспендируемые клетки PBMC удаляли. Клетки HCC827 промывали два раза PBS для удаления остаточного PBMC. Наконец, 100 мл полной среды и 20 мкл цветового проявителя MTS (Promega, кат. № G358B) добавляли и инкубировали в течение 2-3 часов. Спектральную поглощательную способность при 490 нм выявляли с применением микропланшет-ридера.

Как показано на фиг. 12, когда гетеродимерное антитело к Троп-2/CD3 инициировало цитолиз клетками PBMC в отношении опухолевых клеток HCC827, антитело к PD-L1 или антитело к PD-1 может усиливать цитолитический эффект PBMC в отношении опухолевых клеток зависимым от концентрации образом, в то время как гетеродимерное антитело к PD-L1/PD-1 характеризуется более сильной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток, чем моноклональное антитело и комбинации моноклональных антител.

Пример 9. Противоопухолевая эффективность молекулы гетеродимерного антитела к PD-L1/PD-1 в модели с ксенотрансплантацией опухоли

В качестве экспериментальных животных использовали самок NPG (NOD-Prkdc^{scid} Il2rg^{null}) мышей возрастом 6-8 недель, приобретенных у Beijing Vitalstar Biotechnology Co. Ltd. После адаптации к условиям окружающей среды в течение одной недели 5×10^6 HCC827 клеток опухоли легкого человека инокулировали подкожно в правую часть спины каждой

мышь. Когда опухоль выросла до объема опухоли приблизительно 100 мм^3 , мышей группировали согласно объему опухоли, по шесть несущих опухоль мышей в каждой группе. Животным давали соответственно среду (PBS), 70 нмоль/кг моноклонального антитела к PD-L1, 70 нмоль/кг моноклонального антитела к PD-1, фармацевтическую композицию с 70 нмоль/кг моноклонального антитела к PD-L1 + 70 нмоль/кг моноклонального антитела к PD-L1 и 70 нмоль/кг гетеродимера к PD-L1/PD-1 посредством внутривенных инъекций два раза в неделю в течение двух недель. Начиная с даты введения, объемы опухолей измеряли три раза в неделю. Измеряли диаметр по длинной оси a и диаметр по короткой оси b и объемы опухолей рассчитывали в соответствии с формулой: объем опухоли (мм^3) = $(a \times b^2)/2$.

Результаты представлены на фиг. 13. Оба из mAb к PD-L1 и mAb к PD-1 проявляли противоопухолевую эффективность, в то время как гетеродимерное антитело к PD-L1/PD-1 характеризуется более сильной противоопухолевой эффективностью, чем моноклональные антитела и комбинации моноклональных антител. Более того, хороший контроль развития опухоли проявлялся даже после отмены лекарственного средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерное биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий функциональный участок, способный к специфичному связыванию с PD-L1, и второй антигенсвязывающий функциональный участок, способный к специфичному связыванию с PD-1, при этом биспецифичное антитело содержит первую цепь Fc и вторую цепь Fc, связанные одной или несколькими межцепными дисульфидными связями, причем первая цепь Fc и вторая цепь Fc связаны соответственно с антигенсвязывающим функциональным участком для PD-L1 и антигенсвязывающим функциональным участком для PD-1 посредством ковалентной связи или линкера; или первая цепь Fc и вторая цепь Fc связаны соответственно с антигенсвязывающим функциональным участком для PD-1 и антигенсвязывающим функциональным участком для PD-L1 посредством ковалентной связи или линкера; и первая цепь Fc и вторая цепь Fc содержат 5 аминокислотных замен в следующих положениях:

замены аминокислот в положении 366 и 399 на первой цепи Fc и замены аминокислот в положении 351, 407 и 409 на второй цепи Fc,

первая цепь Fc и вторая цепь Fc, содержащие вышеуказанные аминокислотные замены, проявляют тенденцию к образованию гетеродимеров друг с другом, а не к образованию соответствующих гомодимеров,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот в антителе EU по системе Kabat.

2. Гетеродимерное биспецифичное антитело по п. 1, в котором аминокислотные замены на первой цепи Fc и второй цепи Fc являются следующими:

а) замена в положении 351 на глицин, тирозин, валин, пролин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин или триптофан;

б) замена в положении 366 на лейцин, пролин, триптофан или валин;

с) замена в положении 399 на цистеин, аспарагин, изолейцин, глицин, аргинин, треонин или аланин;

д) замена в положении 407 на лейцин, аланин, пролин, фенилаланин, треонин или гистидин;

е) замена в положении 409 на цистеин, пролин, серин, фенилаланин, валин, глутамин или аргинин.

3. Гетеродимерное биспецифичное антитело по п. 1 или п. 2, в котором аминокислотные замены содержат:

a) замены T366L и D399R на первой цепи Fc, замены L351E, Y407L и K409V на второй цепи Fc;

b) замены T366L и D399C на первой цепи Fc, замены L351G, Y407L и K409C на второй цепи Fc;

c) замены T366L и D399C на первой цепи Fc, замены L351Y, Y407A и K409P на второй цепи Fc;

d) замены T366P и D399N на первой цепи Fc, замены L351V, Y407P и K409S на второй цепи Fc;

e) замены T366W и D399G на первой цепи Fc, замены L351D, Y407P и K409S на второй цепи Fc;

f) замены T366P и D399I на первой цепи Fc, замены L351P, Y407F и K409F на второй цепи Fc;

g) замены T366V и D399T на первой цепи Fc, замены L351K, Y407T и K409Q на второй цепи Fc;

h) замены T366L и D399A на первой цепи Fc, замены L351W, Y407H и K409R на второй цепи Fc.

4. Гетеродимерное биспецифичное антитело по п. 1, в котором аминокислотные замены на первой цепи Fc представляют собой T366L и D399R, аминокислотные замены на второй цепи Fc представляют собой L351E, Y407L и K409V.

5. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-4, при этом цепи Fc получены из IgG.

6. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-5, в котором антигенсвязывающие функциональные участки для PD-L1 и PD-1 представляют собой Fab-фрагменты или scFv-фрагменты.

7. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-6, в котором оба антигенсвязывающих функциональных участка для PD-L1 и PD-1 представляют собой Fab-фрагменты.

8. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-6, в котором один из антигенсвязывающих функциональных участков для PD-L1 и PD-1 представляет собой Fab-фрагмент, а другой представляет собой scFv.

9. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 6-8, в котором Fab-фрагмент содержит переменный участок первой тяжелой цепи и переменный участок

второй тяжелой цепи, которые отличаются, и переменный участок первой легкой цепи и переменный участок второй легкой цепи, которые отличаются.

10. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-9, в котором первая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок для PD-L1, связанный с ней, и вторая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок для PD-1, связанный с ней, или первая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок для PD-1, связанный с ней, и вторая цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный участок для PD-L1, связанный с ней, когда они находятся отдельно в присутствии восстанавливающего средства, образуют гомодимеры в соотношении, меньшем чем 50% по массе.

11. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-10, при этом аминокислотная последовательность биспецифичного антитела является выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18.

12. Выделенный полинуклеотид, кодирующий гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-11.

13. Выделенный полинуклеотид по п. 12, при этом последовательность выделенного полинуклеотида является выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17.

14. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид по п. 12 или п. 13.

15. Рекомбинантный вектор экспрессии по п. 14, при этом вектор экспрессии представляет собой плазмидный вектор X0GC, полученный с помощью генной инженерии на основе pCDNA.

16. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п. 12 или п. 13 или рекомбинантный вектор экспрессии по п. 14 или п. 15.

17. Клетка-хозяин по п. 16, которая является выбранной из клеток эмбриональной почки человека HEK293 или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток HEK293, таких как HEK293T, HEK293F, HEK293E; клеток яичника хомяка CHO или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток CHO, таких как CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO; *Escherichia coli* или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе *E. coli*, таких как BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami; дрожжей или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе дрожжей, таких как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*; клеток насекомых или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток

насекомых, таких как High5, SF9; клеток растений; клеток молочной железы млекопитающего, соматических клеток и подобных.

18. Композиция, содержащая гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-11, или выделенный полинуклеотид по п. 12 или п. 13, или рекомбинантный вектор экспрессии по п. 14 или п. 15, или клетку-хозяин по п. 16 или п. 17 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ получения гетеродимерного биспецифичного антитела по любому из пп. 1-11, предусматривающий стадии:

- 1) экспрессии отдельно выделенного полинуклеотида по п. 12 или п. 13 или рекомбинантного вектора экспрессии по п. 14 или п. 15 в клетке-хозяине;
- 2) восстановления белков, экспрессирующихся отдельно в клетке-хозяине; и
- 3) смешивания восстановленных белков, а затем окисления смеси.

20. Способ по п. 19, при этом клетка-хозяин является выбранной из клеток эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток НЕК293, таких как НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е; клеток яичника хомяка CHO или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток CHO, таких как CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO; *Escherichia coli* или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе *E. coli*, таких как BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami; дрожжей или штаммов, полученных с помощью генной инженерии на основе дрожжей, таких как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*; клеток насекомых или клеток, полученных с помощью генной инженерии на основе клеток насекомых, таких как High5, SF9; клеток растений; клеток молочной железы млекопитающего, соматических клеток и подобных.

21. Способ по п. 19 или п. 20, при этом стадия восстановления предусматривает: 1) осуществление реакции восстановления, причем восстанавливающее средство является выбранным из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбоксиил)фосфина, или их химического производного, или их комбинации; 2) удаление восстанавливающего средства.

22. Способ по любому из пп. 19-21, в котором стадия окисления представляет собой окисление в воздушной среде, также предусматривающее осуществление реакции окисления в присутствии окисляющего средства, которое является выбранным из группы, состоящей из L-дегидроаскорбиновой кислоты или других химических производных.

23. Способ по любому из пп. 19-22, дополнительно предусматривающий стадию разделения и очистки.

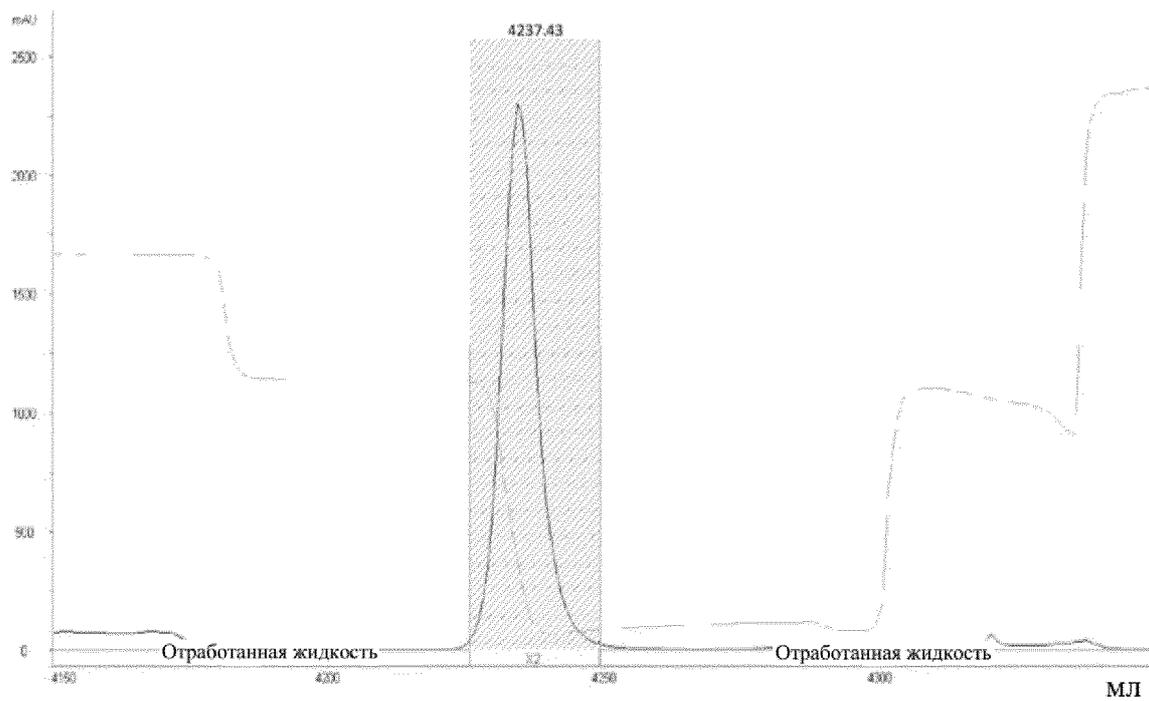
24. Применение гетеродимерного биспецифичного антитела по любому из пп. 1-11, и/или выделенного полинуклеотида по п. 12 или п. 13, и/или рекомбинантного вектора экспрессии по п. 14 или п. 15, и/или клетки-хозяина по п. 16 или п. 17, и/или композиции по п. 18 в производстве лекарственного препарата для предупреждения и/или лечения заболевания у субъекта.

25. Гетеродимерное биспецифичное антитело по любому из пп. 1-11, и/или выделенный полинуклеотид по п. 12 или п. 13, и/или рекомбинантный вектор экспрессии по п. 14 или п. 15, и/или клетка-хозяин по п. 16 или п. 17, и/или композиция по п. 18 для применения в качестве лекарственного препарата для предупреждения и/или лечения заболевания у субъекта.

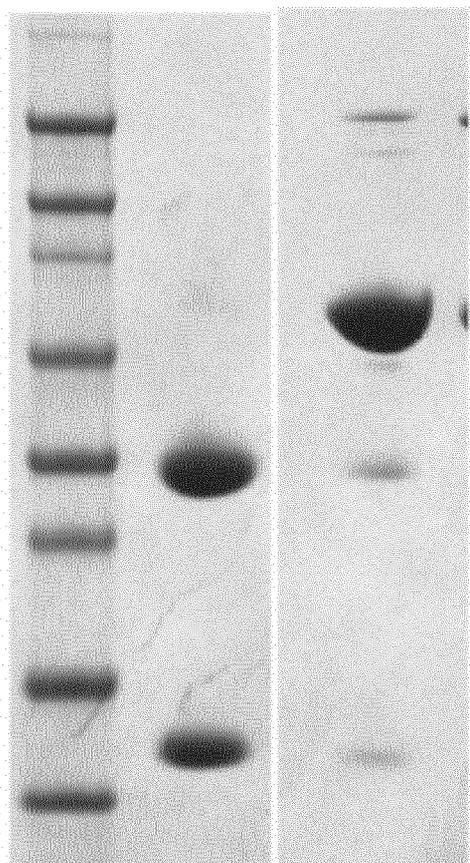
26. Способ предупреждения и/или лечения заболевания, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, гетеродимерного биспецифичного антитела по любому из пп. 1-11, и/или выделенного полинуклеотида по п. 12 или п. 13, и/или рекомбинантного вектора экспрессии по п. 14 или п. 15, и/или клетки-хозяина по п. 16 или п. 17, и/или композиции по п. 18.

27. Применение по п. 24, гетеродимерное биспецифичное антитело, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный вектор экспрессии, клетка-хозяин или композиция по п. 25 или способ по п. 26, при этом субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно, субъекта-человека.

28. Применение по п. 24, гетеродимерное биспецифичное антитело, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный вектор экспрессии, клетка-хозяин или композиция по п. 25 или способ по п. 26, при этом заболевание представляет собой опухоль, выбранную из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, назофарингеальной карциномы, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, карциномы желчного пузыря, рака печени, рака ободочной и прямой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной карциномы, меланомы.



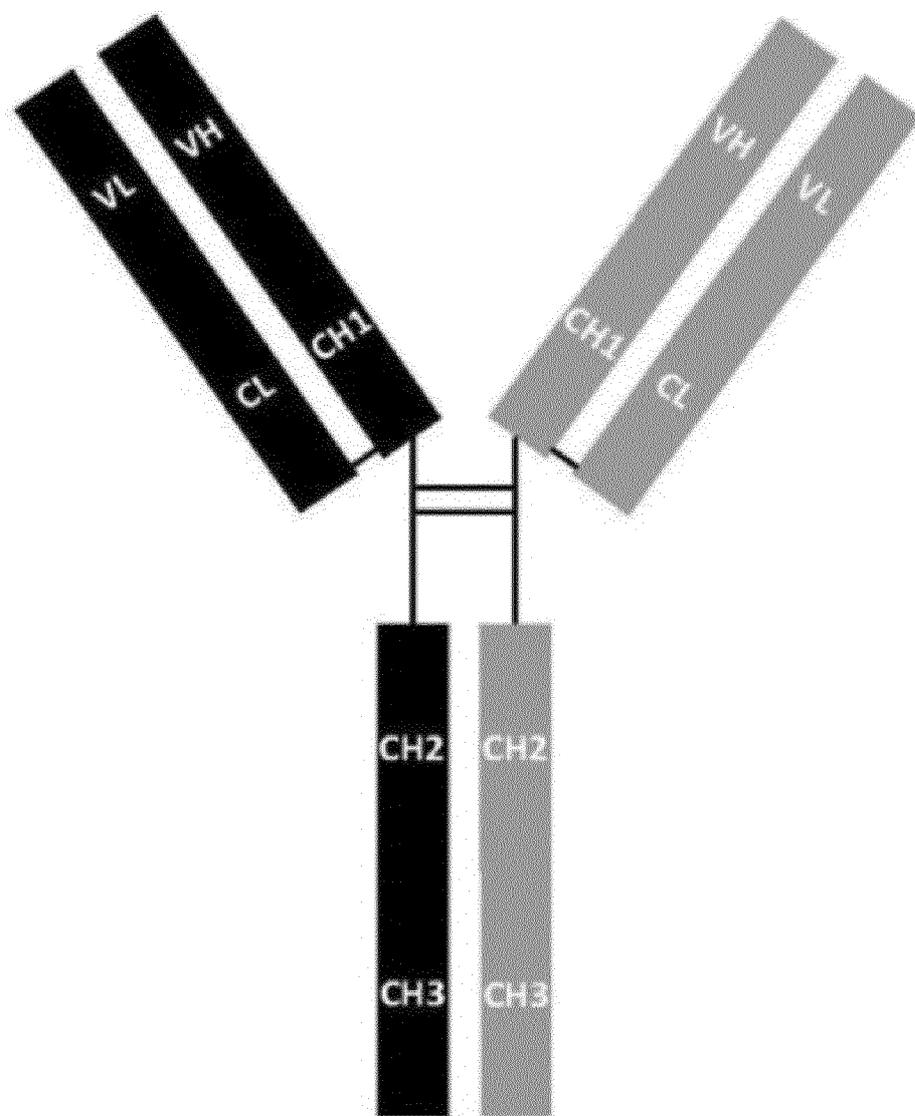
Фиг. 1



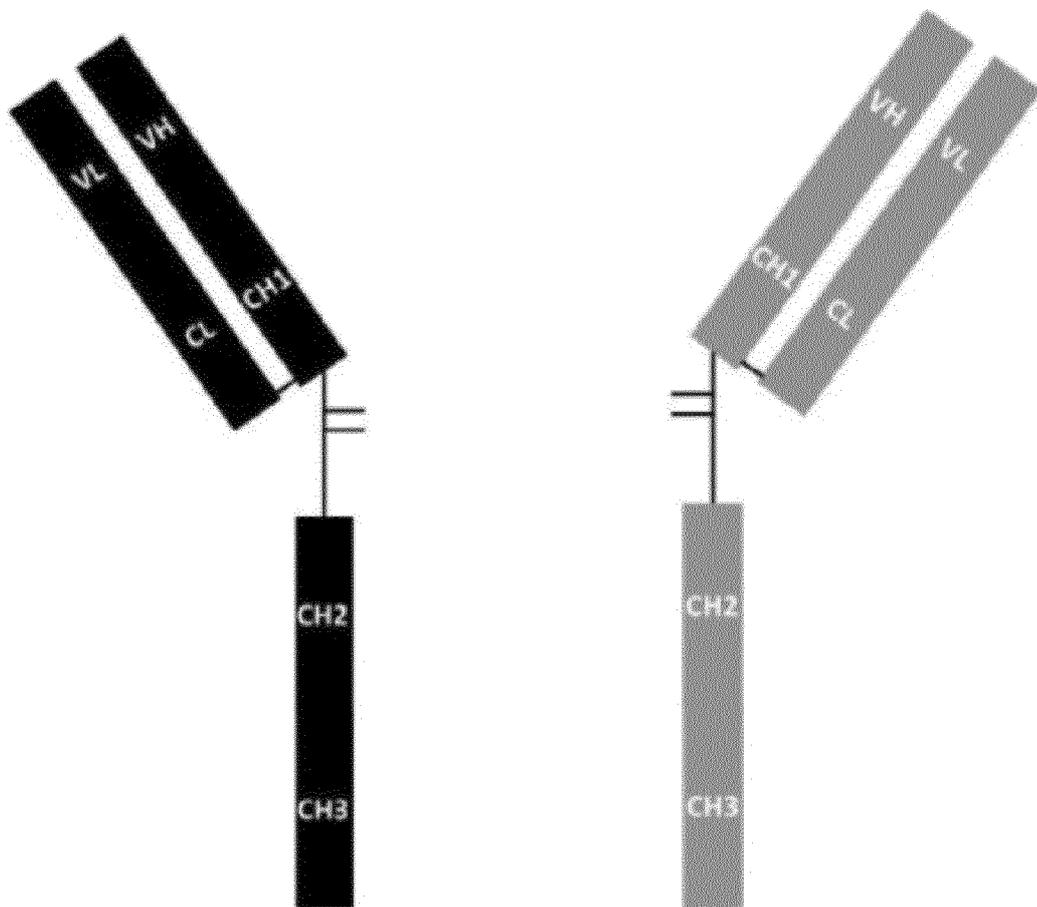
1. Стандарты молекулярной массы
2. Восстановленное
3. Невосстановленное

1 2 3

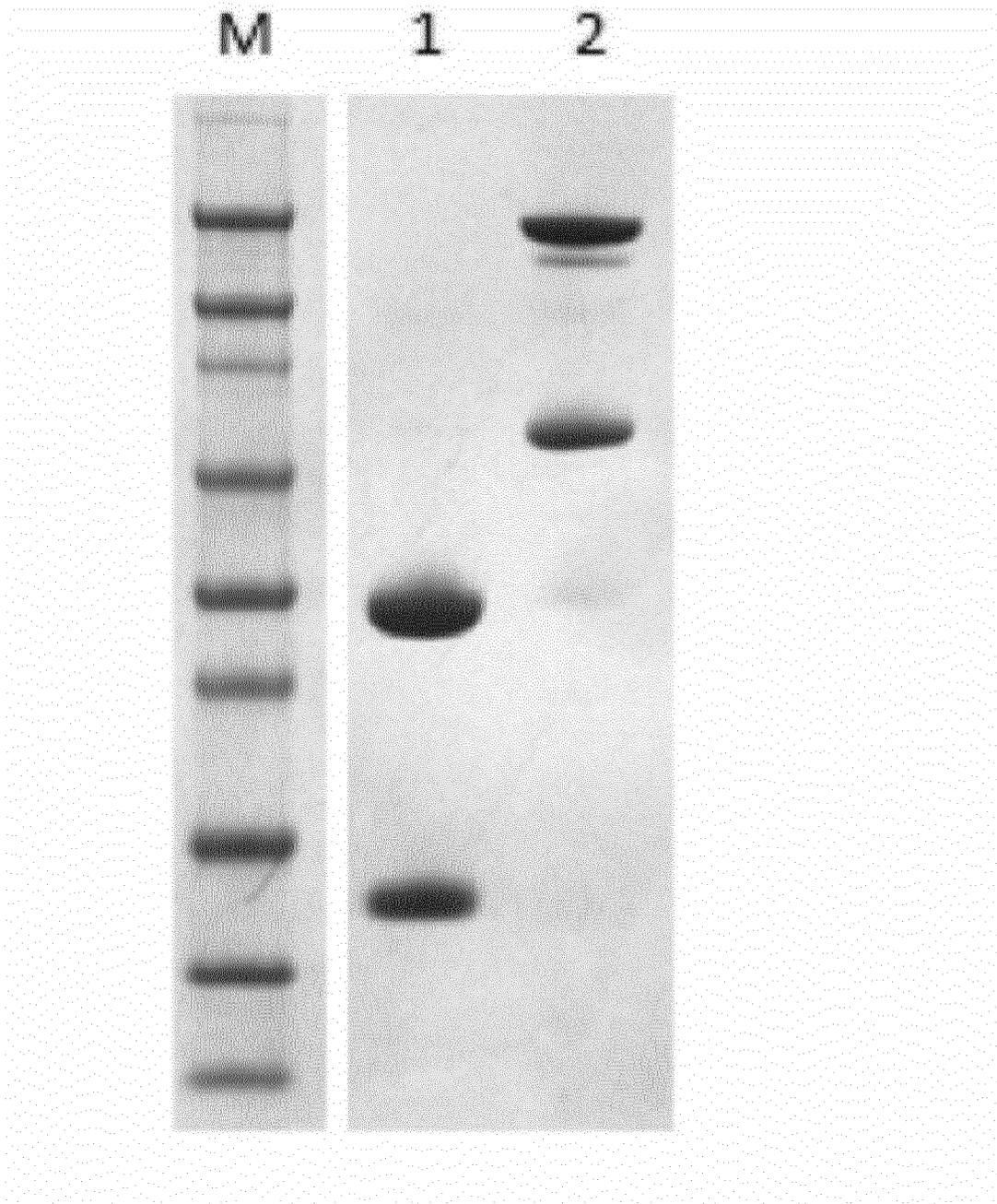
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

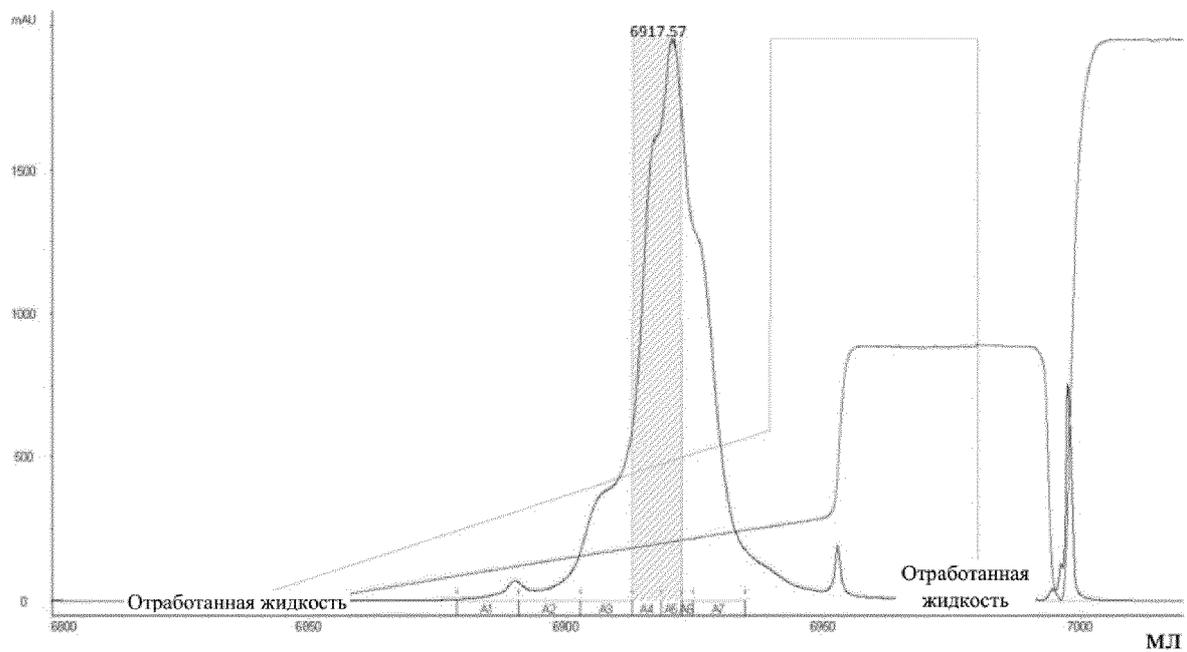


1. Смесь полуантител к PD-L1 и PD-1

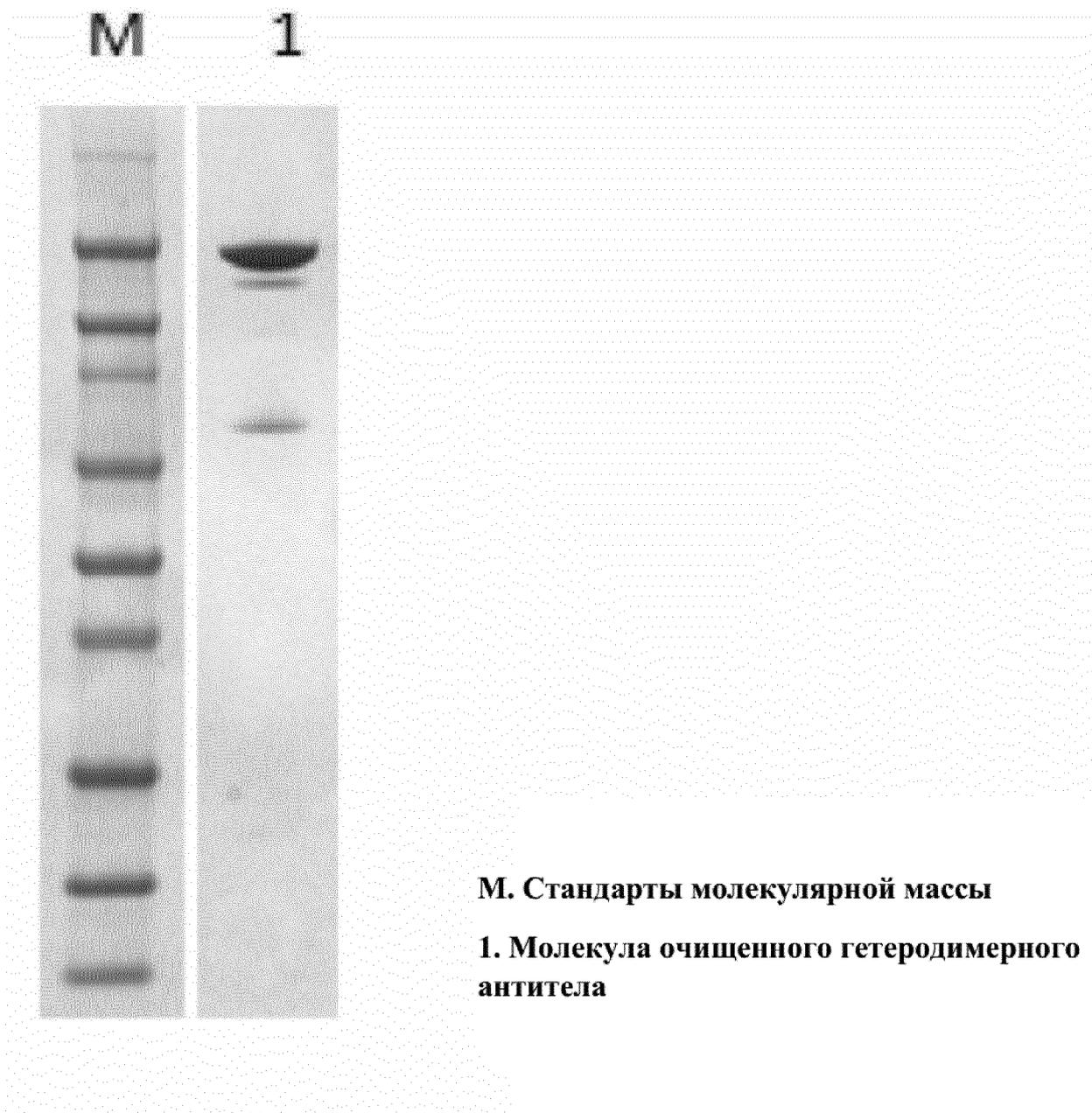
2. Окисленная смесь полуантител к PD-L1 и PD-1

M. Стандарты молекулярной массы

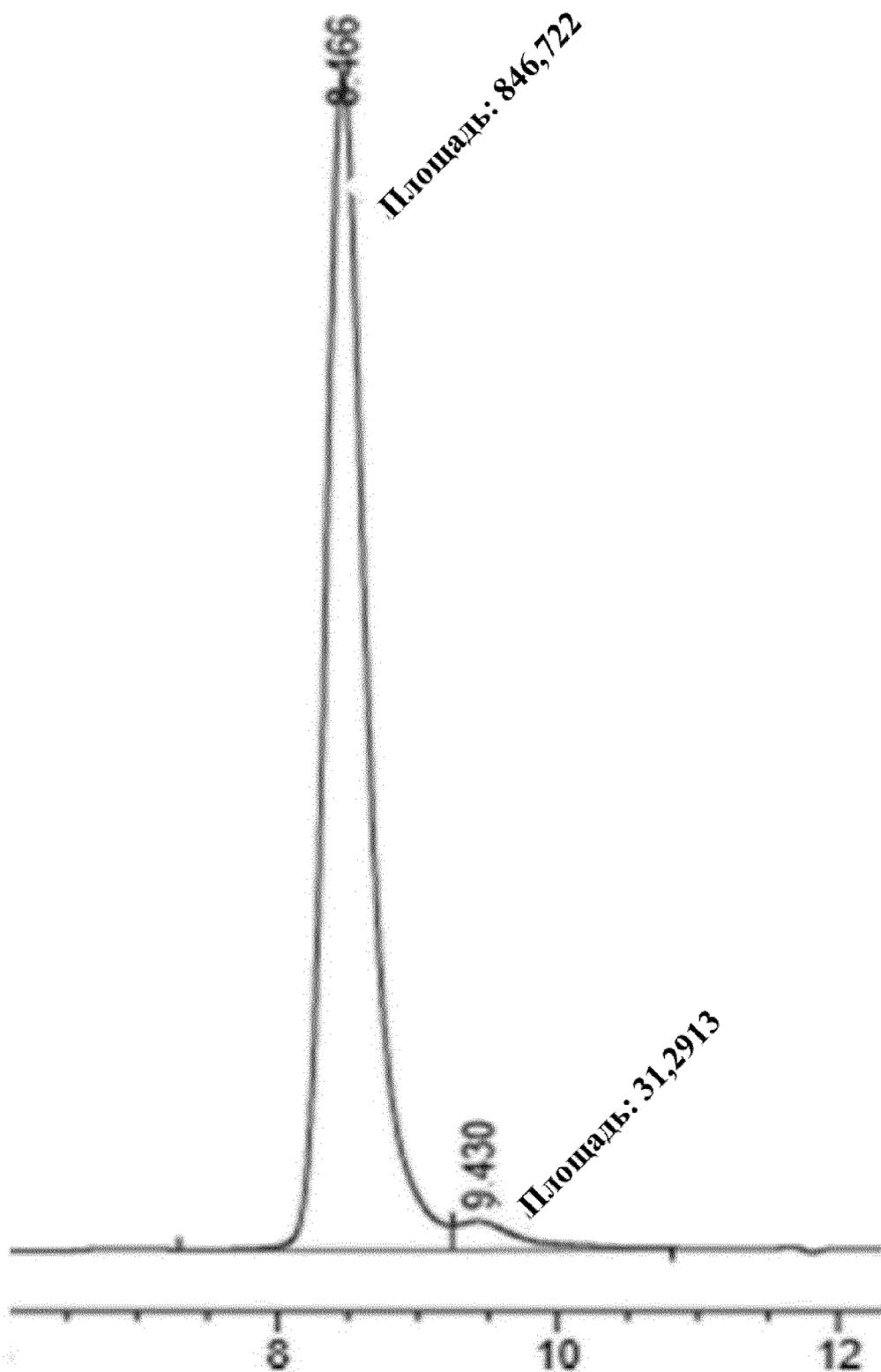
Фиг. 5



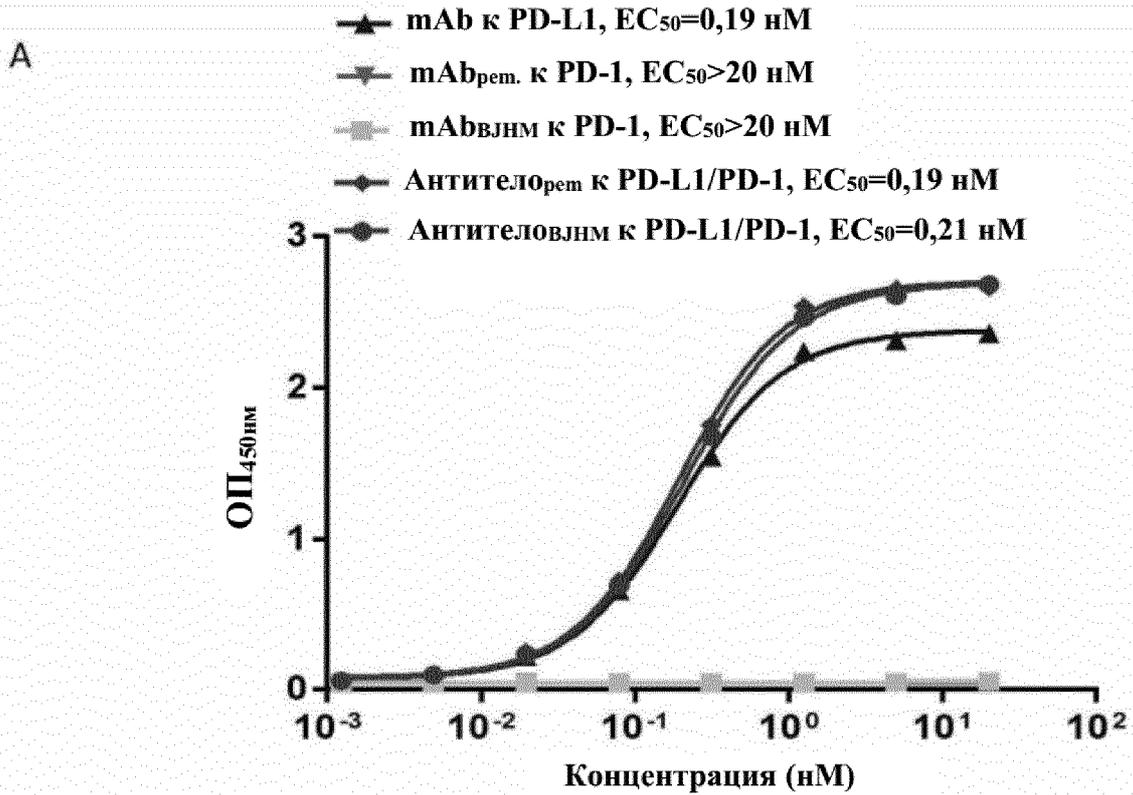
Фиг. 6



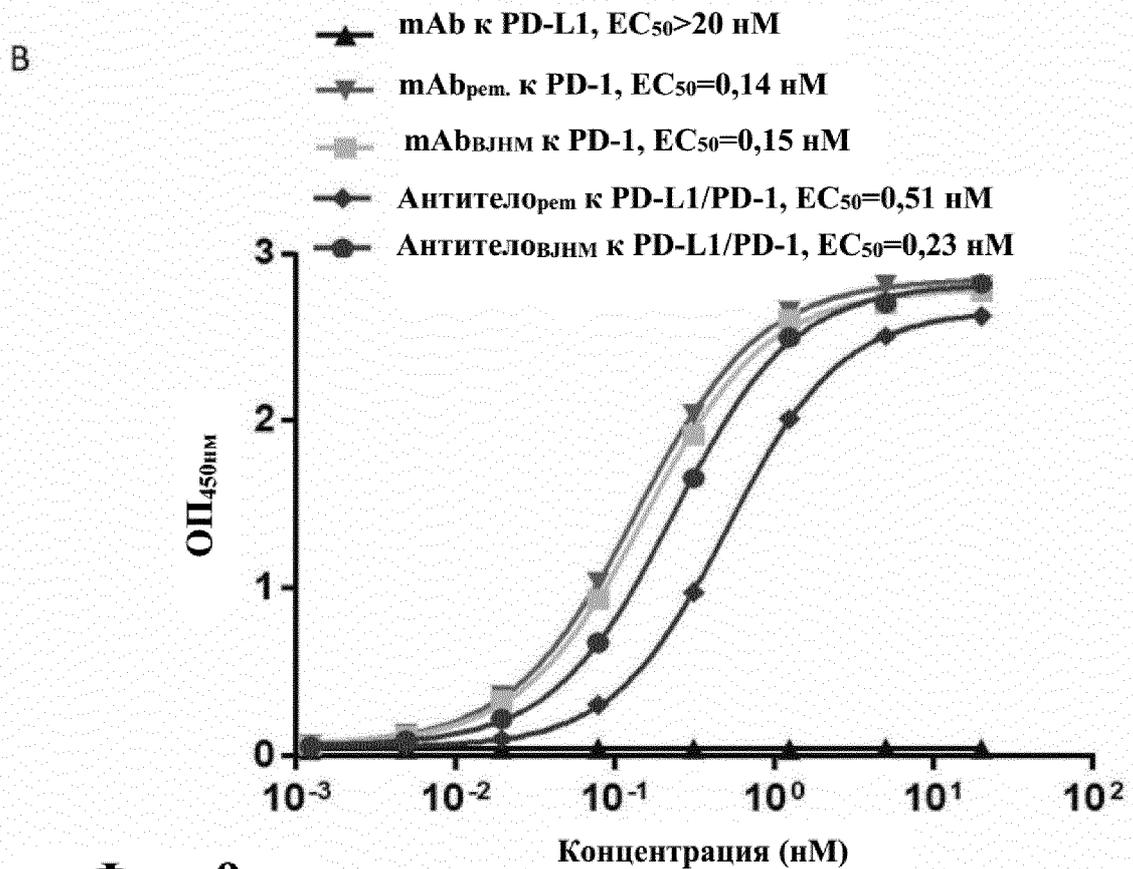
Фиг. 7



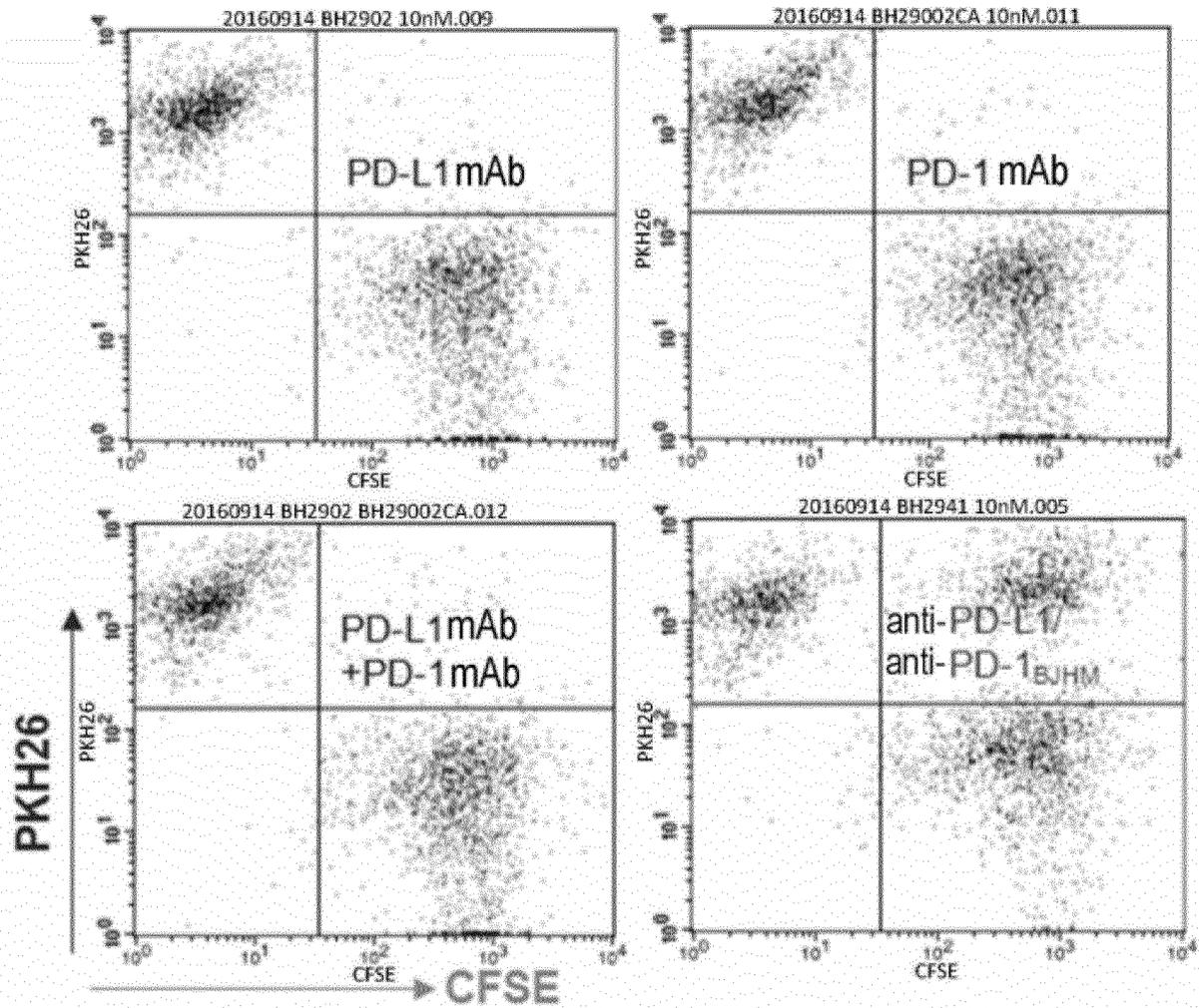
Фиг. 8



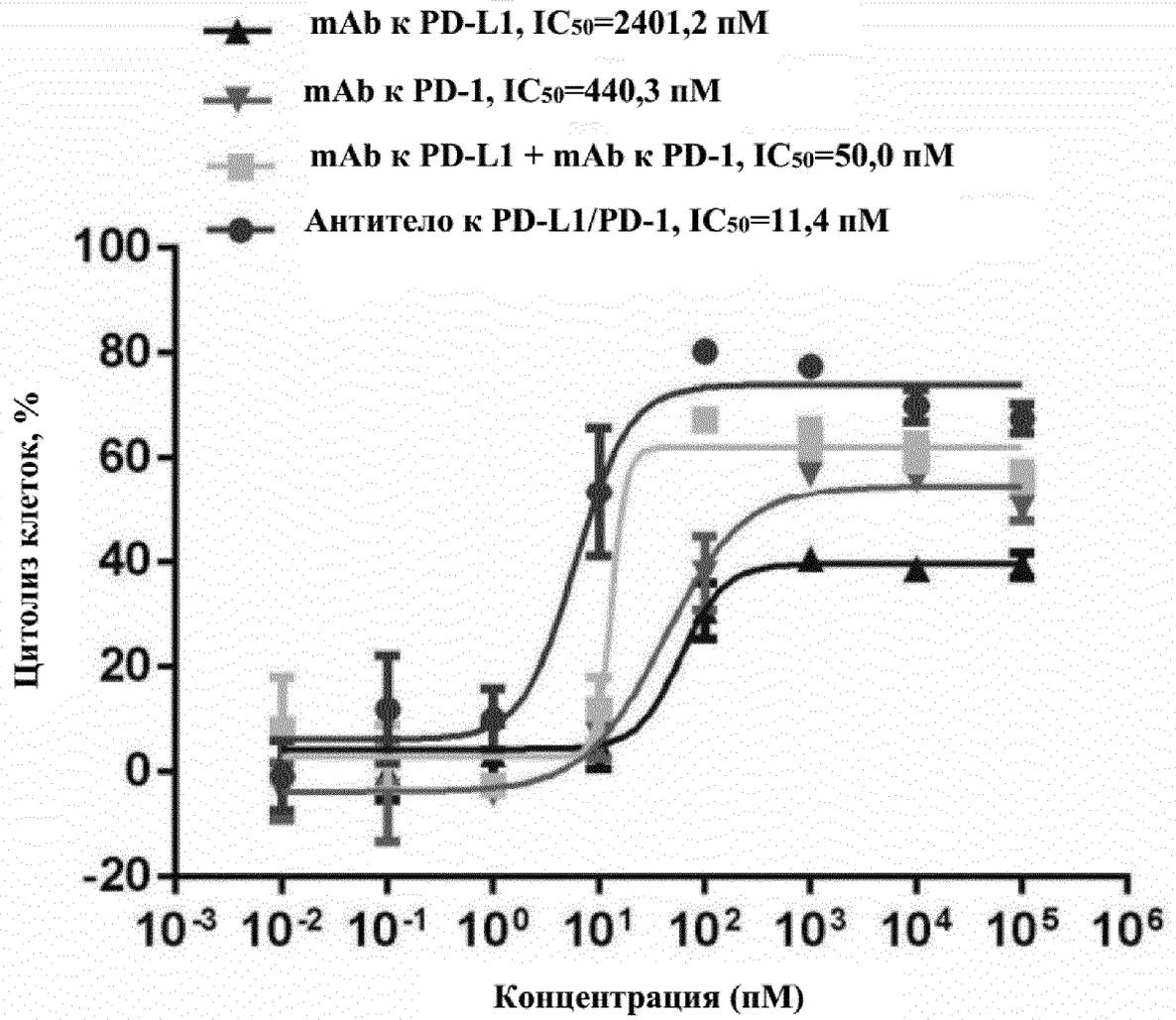
Активность связывания PD-L1



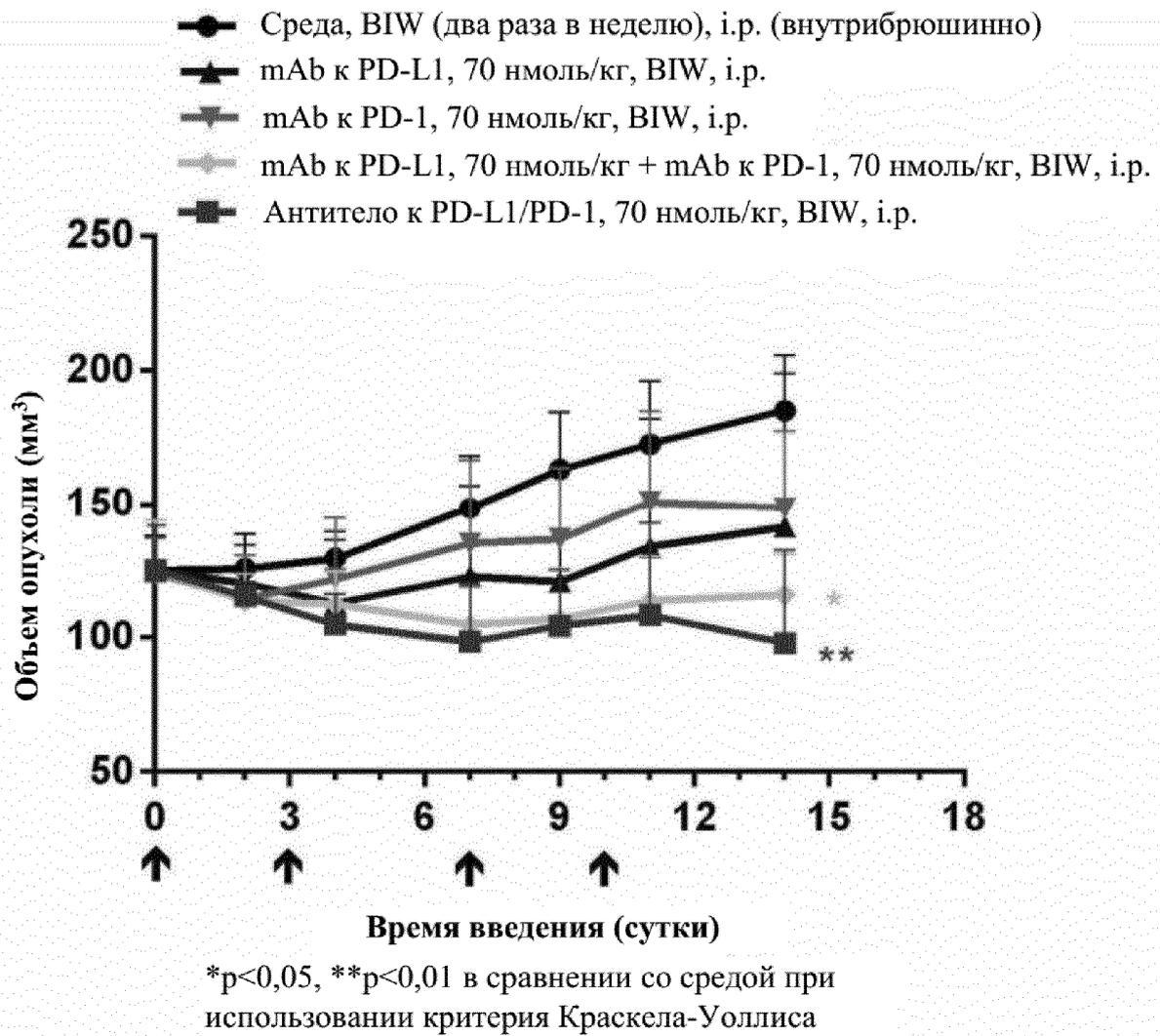
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 12



Фиг. 13