



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.20

(22) Дата подачи заявки
2019.08.30

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) БИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 И ПРОТИВ VEGFA, ЕГО
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201811002548.4

(32) 2018.08.30

(33) CN

(86) PCT/CN2019/103618

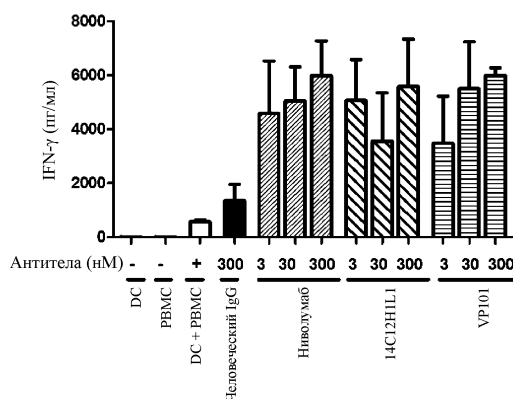
(87) WO 2020/043184 2020.03.05

(71) Заявитель:
АКЕСО БИОФАРМА, ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:
Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь
Максвэлл, Чжан Пэн (CN)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Бифункциональное антитело против VEGFA и против PD-1, его фармацевтическая композиция и его применение относятся к области терапии опухолей и молекулярной иммунологии. Конкретно, бифункциональное антитело против VEGFA и против PD-1 содержит первую белковую функциональную область, направленную на VEGFA, и вторую белковую функциональную область, направленную на PD-1. Указанное бифункциональное антитело может специфично связываться с VEGFA и PD-1, специфично уменьшать иммуносупрессивное действие VEGFA и PD-1 на организм и ингибировать опухоль-индуцированный ангиогенез и, таким образом, имеет хорошие перспективы применения.



PCT/CN2019/103618

МПК: *C07K 16/46* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

БИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 И ПРОТИВ VEGFA, ЕГО
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к областям лечения опухолей и иммунобиологии, в частности к бифункциональному антителу против PD-1(белок программируемой клеточной смерти 1)/VEGFA(фактор роста эндотелия сосудов А), его фармацевтической композиции и его применению. Конкретно, настоящее изобретение относится к бифункциональному антителу против человеческого PD-1 / человеческого VEGFA, его фармацевтической композиции и его применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В современном мире опухоль, особенно злокачественная опухоль, является серьезным угрожающим здоровью заболеванием и второй по распространенности причиной смерти среди различных заболеваний. В последние годы заболеваемость опухолями существенно возрастает. Для злокачественной опухоли характерны неудовлетворительный ответ на лечение, высокая частота позднего метастазирования и неблагоприятный прогноз. Несмотря на то, что традиционные методы лечения (такие как лучевая терапия, химиотерапия и хирургическое лечение), находящие клиническое применение в настоящее время, в значительной степени облегчают боль и увеличивают время выживания, эти методы имеют существенные ограничения, а дальнейшее повышение их эффективности затруднительно.

Существуют две отличающиеся друг от друга стадии опухолевого роста, а именно от стадии медленного роста без кровеносных сосудов до стадии быстрой пролиферации с кровеносными сосудами. Ангиогенез позволяет опухоли получать питание, достаточное для перехода к стадии с кровеносными сосудами, и в отсутствие ангиогенеза размер первичной опухоли не будет превышать 1-2 мм, что не позволит ей метастазировать.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой фактор роста, который может стимулировать деление и пролиферацию эндотелиальных клеток,

стимулировать образование новых кровеносных сосудов и улучшать проницаемость кровеносных сосудов, и он связывается с рецепторами фактора роста эндотелия сосудов на поверхности клеток и действует, активируя тирозинкиназные пути передачи сигналов. В опухолевых тканях клетки опухоли и макрофаги и тучные клетки, проникающие в опухоли, могут секретировать VEGF на высоком уровне, стимулировать эндотелиальные клетки опухолевых сосудов в паракринной форме, стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, индуцировать ангиогенез, стимулировать непрерывный рост опухоли, улучшать проницаемость сосудов, приводить к отложению фибрина в окружающих тканях и стимулировать инфильтрацию мононуклеарными клетками, фибробластами и эндотелиальными клетками, что способствует образованию стромы опухоли и проникновению опухолевых клеток в новые кровеносные сосуды, и стимулировать метастазирование опухоли. Поэтому ингибирование опухолевого ангиогенеза рассматривают в настоящее время как один из наиболее перспективных методов лечения опухолей. Семейство VEGF включает VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и PlGF. Рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) включают VEGFR1 (также известный как Flt1), VEGFR2 (также известный как KDR или Flk1), VEGFR3 (также известный как Flt4) и нейропилин-1 (NRP-1). Первые три рецептора сходны по структуре, принадлежат к суперсемейству тирозинкиназ и состоят из экстрамембранной области, трансмембранного сегмента и интрамембранной области, где экстрамембранная область состоит из иммуноглобулиноподобного домена, а интрамембранная область представляет собой тирозинкиназную область. VEGFR1 и VEGFR2 расположены главным образом на поверхности эндотелиальных клеток сосудов, а VEGFR3 расположен главным образом на поверхности лимфатических эндотелиальных клеток.

Молекулы семейства VEGF имеют разную аффинность в отношении этих рецепторов. VEGFA действует главным образом в комбинации с VEGFR1, VEGFR2 и NRP-1. VEGFR1 был обнаружен раньше других рецепторов и в обычных физиологических условиях имеет более высокую аффинность в отношении VEGFA, чем VEGFR2, но тирозиназная активность внутриклеточного сегмента у него ниже, чем у VEGFR2 (Ma Li, J. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24 (5): 146-148 (2016)).

VEGFR2 является основным регулятором ангиогенеза и развития сосудов и имеет намного более высокую тирозинкиназную активность, чем VEGFR1. VEGFR2,

после связывания с лигандом VEGFA, опосредует пролиферацию, дифференцировку и тому подобное в эндотелиальных клетках сосудов, а также процесс образования кровеносных сосудов и проницаемость кровеносных сосудов (Roskoski R Jr. *et al.*, *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(3): 179-213 (2007)). VEGFA, после связывания с VEGFR2, опосредует транскрипционную экспрессию генов связанных с ним внутриклеточных белков через последующий сигнальный путь PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK и посредством этого стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов (Takahashi T *et al.*, *Oncogene*, 18(13): 2221-2230 (1999)).

VEGFR3 является одним из представителей семейства тирозинкиназ и экспрессирован главным образом на эндотелиальных клетках эмбриональных сосудов и лимфатических эндотелиальных клетках взрослого типа, и VEGFC и VEGFD связываются с VEGFR3, стимулируя пролиферацию и миграцию лимфатических эндотелиальных клеток и образование новых лимфатических сосудов; NRP-1 является нетирозинкиназным трансмембранным белком и не обладает способностью к независимой передаче биологических сигналов, и он способен опосредовать передачу сигналов только после образования комплекса с тирозинкиназным рецептором VEGF. (Ma Li, *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24(5): 146-148 (2016)).

VEGFA и VEGFR2 вовлечены главным образом в регуляцию ангиогенеза, где до и после связывания VEGFA с VEGFR2 происходит каскадное взаимодействие множества промежуточных сигналов в предшествующих и последующих путях и, в конечном счете, изменение физиологических функций вследствие пролиферации, выживания, миграции, повышения проницаемости эндотелиальных клеток, инфильтрации периферических тканей эндотелиальными клетками и так далее (Dong Hongchao *et al.*, Sep. 2014, *Journal of Modern Oncology*, 22(9): 2231-3).

В настоящее время есть несколько гуманизированных моноклональных антител, направленных на человеческий VEGF, в частности VEGFA, такие как бевацизумаб, который в 2004 г. был последовательно одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для лечения различных опухолей, таких как немелкоклеточный рак легкого, почечноклеточная карцинома, рак шейки матки и метастатический колоректальный рак.

Рецептор запрограммированной гибели клеток 1-го типа (PD-1), также известный как CD279, представляет собой мембранный поверхностный рецептор,

являющийся трансмембранным гликопротеином I-го типа, принадлежащим к иммуноглобулиновому суперсемейству CD28, и обычно экспрессирован в Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. У PD-1 есть два естественных лиганда, PD-L1 и PD-L2. Как PD-L1, так и PD-L2 принадлежат к суперсемейству B7 и экспрессированы конститутивным или индуцируемым образом на поверхности мембраны множества клеток, включая негемопозитические клетки и множество опухолевых клеток. PD-L1 экспрессирован главным образом на Т-клетках, В-клетках, DC (дендритных клетках), эндотелиальных клетках микрососудов и множестве опухолевых клеток, в то время как PD-L2 экспрессирован только на антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги. Взаимодействие между PD-1 и его лигандами может ингибировать активацию лимфы, пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов, таких как IL-2 (интерлейкин 2) и IFN- γ (интерферон- γ).

Во многих исследованиях показано, что опухолевое микроокружение может защищать опухолевые клетки от повреждения иммунными клетками, экспрессия PD-1 в лимфоцитах, инфильтрирующих опухолевое микроокружение, повышена и ткани множества первичных опухолей, таких как рак легкого, рак печени, рак яичника, рак кожи, рак толстой кишки и глиома, положительны в отношении PD-L1 при иммуногистохимическом анализе. В то же время, у раковых пациентов экспрессия PD-L1 в опухоли значимо коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Блокирование взаимодействия между PD-1 и его лигандами может стимулировать опухолеспецифический Т-клеточный иммунитет и повышать эффективность иммунного устранения опухолевых клеток. Во многих клинических исследованиях показано, что антитела, направленные на PD-1 или PD-L1, могут стимулировать инфильтрацию опухолевых тканей CD8⁺ Т-клетками и приводить к повышающему регулированию противоопухолевых иммунных эффекторных факторов, таких как IL-2, IFN- γ , гранзим В и перфорин, эффективно ингибируя посредством этого рост опухолей.

Кроме того, антитела против PD-1 могут также быть использованы в лечении хронических вирусных инфекций. Хронические вирусные инфекции часто сопровождаются потерей функции вирус-специфических эффекторных Т-клеток и уменьшением их количества. Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 может быть заблокировано введением антитела к PD-1, приводящим к эффективному ингибированию истощения эффекторных Т-клеток при хронической вирусной

инфекции.

Ввиду широкого противоопухолевого спектра и неожиданной эффективности антител к PD-1, в данной области принято считать, что антитела, направленные на путь PD-1, приведут к прорывам в лечении множества опухолей: немелкоклеточного рака легкого, почечноклеточного рака, рака яичника и меланомы (Homet M. B., Parisi G., *et al.*, Anti-PD-1 therapy in melanoma. *Semin Oncol.* 2015 Jun; 42(3): 466-473), и лимфомы и анемии (Held SA, Heine A, *et al.*, Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. *Curr Cancer Drug Targets* 2013 Sep; 13(7): 768-74).

Бифункциональное антитело, также известное как биспецифическое антитело, представляет собой специфическое лекарственное средство, которое направлено на два разных антигена одновременно и может быть получено посредством иммуноселективной очистки. Кроме того, биспецифическое антитело может также быть получено посредством генной инженерии, что имеет определенные преимущества благодаря соответствующей гибкости в таких аспектах, как оптимизация сайтов связывания, учет синтетической формы и выход. К настоящему моменту продемонстрировано, что биспецифические антитела существуют в более чем 45 формах (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: current perspectives. *BioDrugs* 2010; 24: 89-98). Был разработан ряд биспецифических антител в форме IgG-scFv, а именно в форме Morrison (Coloma M. J., Morrison S. L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat Biotechnol.*, 1997; 15: 159-163), которая, как было показано, является одной из идеальных форм биспецифических антител ввиду ее сходства с естественной формой IgG и преимуществ при конструировании, экспрессии и очистке антител (Miller B. R., Demarest S. J., *et al.*, Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. *Protein Eng Des Sel* 2010; 23: 549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. *MAbs* 2011; 3: 299-309).

В настоящее время существует потребность в разработке лекарственного средства на основе бифункционального антитела, направленного как на PD-1, так и на VEGF (например, VEGFA).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В результате тщательной исследовательской работы и творческих усилий и на

основе имеющегося в продаже моноклонального антитела к VEGFA Авастин (бевацизумаб) и 14C12H1L1, полученного ранее (см. публикацию патента Китая № CN106977602A), авторы изобретения получили гуманизированное бифункциональное антитело, названное VP101, способное одновременно связываться с VEGFA и PD-1 и блокировать связывание VEGFA с VEGFR2 и связывание PD-1 с PD-L1.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что VP101 способен:

эффективно связываться с PD-1 на поверхности человеческих иммунных клеток, уменьшая иммуносупрессию, опосредованную PD-L1 и PD-1 и стимулируя секрецию IFN- γ и IL-2 человеческими иммунными клетками;

эффективно ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов, индуцированную VEGFA, ингибируя посредством этого опухоль-индуцированный ангиогенез; и/или

обладать потенциалом применения для изготовления лекарственных средств для предотвращения и лечения злокачественных опухолей, таких как рак печени, рак легкого, меланома, опухоль почки, рак яичника и лимфома.

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу, содержащему:

первую белковую функциональную область, направленную на VEGFA; и
вторую белковую функциональную область, направленную на PD-1;
предпочтительно,

первая белковая функциональная область представляет собой антитело против VEGFA или его антигенсвязывающий фрагмент, где переменная область тяжелой цепи антитела против VEGFA содержит HCDR1 (определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1) - HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи антитела против VEGFA содержит LCDR1 (определяющий комплементарность участок легкой цепи 1) - LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно; и

вторая белковая функциональная область представляет собой антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где переменная область тяжелой цепи

антитела против PD-1 содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи антитела против PD-1 содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

антитело против VEGFA или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента участка, определяющего комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела;

и/или

антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента участка, определяющего комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения биспецифическое антитело имеет форму IgG-scFv.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи этого иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи этого иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи этого одноцепочечного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи этого одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно;

или

первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи этого одноцепочечного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи этого одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи этого иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи этого иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно.

В конкретном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее:

первую белковую функциональную область, направленную на VEGFA; и

вторую белковую функциональную область, направленную на PD-1;

где:

первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно;

или

первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит

HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11;

или

аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

иммуноглобулин содержит область, не являющуюся CDR, имеющую происхождение из вида, отличного от мыши, например из человеческого антитела.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено

биспецифическое антитело, где:

иммуноглобулин содержит константные области, имеющие происхождение из человеческого антитела;

предпочтительно, константные области иммуноглобулина выбраны из константных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-1 человеческого Ig или С-область цепи гамма-4 человеческого Ig и его константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа человеческого Ig.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения константные области иммуноглобулина гуманизированы. Например, каждая константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа P01857, и каждая константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа P01834.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где первая белковая функциональная область и вторая белковая функциональная область связаны непосредственно или через линкерный фрагмент;

предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой (GGGGS)_m, где m представляет собой положительное целое число, такое как 1, 2, 3, 4, 5 или 6, а GGGGS (SEQ ID NO:14) является составной единицей линкера.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где каждое из числа первых белковых функциональных областей и числа вторых белковых функциональных областей независимо представляет собой 1, 2 или более.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где присутствуют 1 иммуноглобулин и 2 одноцепочечных антитела, предпочтительно два идентичных одноцепочечных антитела.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где иммуноглобулин представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE

или IgM, предпочтительно IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина. Поскольку иммуноглобулин имеет две тяжелые цепи, с одной молекулой иммуноглобулина связаны две молекулы одноцепочечного антитела. Предпочтительно, две молекулы одноцепочечного антитела идентичны.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где присутствуют два одноцепочечных антитела и один конец каждого одноцепочечного антитела связан с С-концом или N-концом одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения между V_H и V_L одноцепочечного антитела присутствует дисульфидная связь. Способы введения дисульфидной связи между V_H и V_L антитела хорошо известны в данной области, см., например, US 5747654, Rajagopal *et al.*, *Prot. Engin.* 10(1997)1453-1459, Reiter *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14(1996)1239-1245, Reiter *et al.*, *Protein Engineering* 8(1995)1323-1331, Webber *et al.*, *Molecular Immunology* 32(1995)249-258, Reiter *et al.*, *Immunity* 2(1995)281-287, Reiter *et al.*, *JBC* 269(1994)18327-18331, Reiter *et al.*, *Inter. J. of Cancer* 58(1994)142-149, и Reiter *et al.*, *Cancer Res.* 54(1994)2714-2718, включенные сюда посредством ссылки.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где биспецифическое антитело связывается с белком VEGFA и/или белком PD-1 с K_D менее чем 10^{-5} М, такой как менее чем 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее; предпочтительно, K_D измерена прибором для оценки молекулярных взаимодействий Fortebio.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

указанное биспецифическое антитело связывается с белком VEGFA с EC_{50} менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,15 нМ или менее 0,14 нМ; предпочтительно, EC_{50} определена непрямой ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ);

и/или

указанное биспецифическое антитело связывается с белком PD-1 с EC_{50} менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,17 нМ, менее 0,16 нМ или менее 0,15 нМ;

предпочтительно, EC_{50} определена непрямым ELISA.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей биспецифическое антитело по любому воплощению настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или содержащей вектор по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения, включающему культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящих условиях и выделение биспецифического антитела из клеточных культур.

Другой аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему биспецифическое антитело и конъюгированную группировку, где биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело по любому воплощению настоящего изобретения и конъюгированная группировка представляет собой выявляемую метку; предпочтительно, конъюгированная группировка представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему биспецифическое антитело по любому воплощению настоящего изобретения или содержащему конъюгат по настоящему изобретению;

предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, способное специфично связываться с указанным биспецифическим антителом; возможно, второе антитело дополнительно содержит выявляемую метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения в изготовлении набора для определения присутствия или уровня VEGFA и/или PD-1 в образце.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело по любому воплощению настоящего изобретения или содержащей конъюгат по настоящему изобретению; возможно, она дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

Биспецифическое антитело по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде любой лекарственной формы, известной в области фармацевтики, такой как таблетка, пилюля, суспензия, эмульсия, раствор, гель, капсула, порошок, гранула, эликсир, пастилка, суппозиторий, лекарственная форма для инъекций (включая раствор для инъекций, стерильный порошок для инъекций и концентрированный раствор для инъекций), лекарственная форма для ингаляций и спрей. Предпочтительная лекарственная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению должна быть стерильной и стабильной в условиях изготовления и хранения. Одной предпочтительной лекарственной формой является лекарственная форма для инъекций. Такие лекарственные формы для инъекций могут представлять собой стерильные растворы для инъекций. Например, стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены следующим способом: необходимое количество биспецифического антитела по настоящему изобретению добавляют в подходящий растворитель и, возможно, в то же время добавляют другие желаемые ингредиенты (включая, без ограничения, регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты, агенты, увеличивающие ионную силу, изотонические агенты, консерванты, разбавители или любую их комбинацию) с последующими фильтрацией и стерилизацией. Кроме того, стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены в форме стерильных лиофилизированных порошков (например, посредством вакуумной сушки или лиофилизации) для удобства хранения и применения. Такие стерильные лиофилизированные порошки могут быть диспергированы в подходящем носителе (например, стерильной апиrogenной воде) перед применением.

Кроме того, биспецифическое антитело по настоящему изобретению может присутствовать в фармацевтической композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения. В некоторых воплощениях стандартная доза составляет по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере

15 мг, по меньшей мере 20 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или по меньшей мере 100 мг. Там, где фармацевтическая композиция представлена в жидкой лекарственной форме (например, для инъекций), она может содержать биспецифическое антитело по настоящему изобретению в концентрации по меньшей мере 0,1 мг/мл, такой как по меньшей мере 0,25 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

Биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области, включая, без ограничения, пероральный, трансбуккальный, сублингвальный, глазной, местный, парентеральный, ректальный, интратекальный, интрацестернальный, паховый, интравезикальный, местный (например, порошок, мазь или капли) или назальный путь введения. Тем не менее, для многих вариантов терапевтического применения предпочтительным путем/способом введения является парентеральный (такой как внутривенная инъекция, подкожная инъекция, внутрибрюшинная инъекция и внутримышечная инъекция). Специалистам в данной области будет ясно, что путь и/или способ введения будут варьировать в зависимости от предполагаемой задачи. В предпочтительном воплощении биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят внутривенной инфузией или инъекцией.

Биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция, предложенные здесь, могут быть использованы по отдельности или в комбинации или использованы в комбинации с дополнительными фармацевтически активными агентами (например, лекарственным средством для химиотерапии опухолей). Такой дополнительный фармацевтически активный агент можно вводить до, одновременно с или после введения биспецифического антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении схема введения может быть скорректирована для достижения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или

профилактического ответа). Например, она может представлять собой однократное введение, может представлять собой многократное введение на протяжении некоторого периода времени или может характеризоваться снижением или повышением дозы пропорционально степени неотложности лечения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению в изготовлении:

(1)

лекарственного средства или агента для определения уровня VEGFA в образце,
 лекарственного средства или агента для блокирования связывания VEGFA с VEGFR2,

лекарственного средства или агента для понижающего регулирования активности или уровня VEGFA,

лекарственного средства или агента для уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

лекарственного средства или агента для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

лекарственного средства или агента для блокирования опухолевого ангиогенеза;
 и/или

(2)

лекарственного средства или агента для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,
 лекарственного средства или агента для понижающего регулирования активности или уровня PD-1,

лекарственного средства или агента для уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

лекарственного средства или агента для стимулирования секреции IFN- γ Т-лимфоцитами или

лекарственного средства или агента для стимулирования секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

В одном воплощении настоящего изобретения применение не является терапевтическим и/или не является диагностическим.

Другой аспект настоящего изобретения относится к *in vivo* или *in vitro* способу, включающему введение в клетку эффективного количества биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению, выбранному из:

(1)

способа определения уровня VEGFA в образце,
способа блокирования связывания VEGFA с VEGFR2,
способа понижающего регулирования активности или уровня VEGFA,
способа уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

способа ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

способа блокирования опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

способа блокирования связывания PD-1 с PD-L1,

способа понижающего регулирования активности или уровня PD-1,

способа уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

способа стимулирования секреции IFN- γ Т-лимфоцитами или

способа стимулирования секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

В одном воплощении настоящего изобретения *in vitro* способ не является терапевтическим и/или не является диагностическим.

В *in vitro* эксперименте по настоящему изобретению как антитело против VEGFA, так и бифункциональное антитело против VEGFA/PD-1 могут ингибировать пролиферацию клеток HUVEC и как антитело против PD-1, так и бифункциональное

антитело против VEGFA/PD-1 могут стимулировать секрецию IFN- γ и/или IL-2 и активировать иммунную реакцию.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

Типичный неограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективного количества биспецифического антитела по настоящему изобретению составляет 0,02-50 мг/кг, например 0,1-50 мг/кг, 0,1-25 мг/кг или 1-10 мг/кг. Следует отметить, что доза может варьировать в зависимости от типа и тяжести симптома, подлежащего лечению. Кроме того, специалистам в данной области будет ясно, что для любого конкретного пациента конкретная схема введения будет скорректирована с течением времени в соответствии с потребностями пациента и профессиональным суждением врача; диапазоны доз приведены здесь исключительно в целях наглядности и не ограничивают применение или объем фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек.

Предложены биспецифическое антитело или конъюгат по любому воплощению настоящего изобретения для применения в предотвращении и/или лечении злокачественной опухоли, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

Предложены биспецифическое антитело или конъюгат по любому воплощению настоящего изобретения для применения в:

(1)

определении уровня VEGFA в образце,
 блокировании связывания VEGFA с VEGFR2,
 понижающего регулирования активности или уровня VEGFA,
 уменьшении стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию
 эндотелиальных клеток сосудов,

ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

блокировании опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

блокировании связывания PD-1 с PD-L1,

понижающего регулирования активности или уровня PD-1,

уменьшении иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

стимулировании секреции IFN- γ Т-лимфоцитами или

стимулировании секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

Лекарственные средства на основе антител, особенно моноклональные антитела, позволили достичь хорошей эффективности в лечении различных заболеваний. Традиционные экспериментальные методы получения этих терапевтических антител состоят в иммунизации животных антигеном и получении антител, направленных на антиген, у иммунизированных животных или в улучшении этих антител с более низкой аффинностью в отношении антигена посредством созревания аффинности.

Связывание с антигеном определяют переменные области легкой цепи и тяжелой цепи; переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременной участка, называемых участками, определяющими комплементарность (CDR) (CDR тяжелой цепи (H-цепи) включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и CDR легкой цепи (L-цепи) включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, названные согласно Kabat *et al.*, см. Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication (1-3) 1991: 91-3242).

Предпочтительно, CDR могут также быть определены по системе нумерации IMGT, см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." *Nucleic acids*

research 38.suppl_1 (2009): D301-D307.

Аминокислотные последовательности CDR-участков последовательностей моноклональных антител, представленные в (1)-(13) ниже, были проанализированы с использованием технических средств, хорошо известных специалистам в данной области, например базы данных VBASE2, и определения IMGT, и были получены следующие результаты.

(1) Бевацизумаб

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO:7.

Аминокислотные последовательности 3 CDR-участков его вариабельной области тяжелой цепи представляют собой следующее:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO:15);

HCDR2: INTYTGER (SEQ ID NO:16);

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO:17).

Аминокислотные последовательности 3 CDR-участков его вариабельной области легкой цепи представляют собой следующее:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO:18);

LCDR2: FTS (SEQ ID NO:19);

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO:20).

(2) 14C12H1L1

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO:11.

Аминокислотные последовательности 3 CDR-участков его вариабельной области тяжелой цепи представляют собой следующее:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO:21);

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO:22);

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:23).

Аминокислотные последовательности 3 CDR-участков его вариабельной области легкой цепи представляют собой следующее:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO:24);

LCDR2: RAN (SEQ ID NO:25);

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:26).

(3) VP101

Аминокислотные последовательности 9 CDR-участков его тяжелых цепей представляют собой следующее:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO:15);

HCDR2: INTYTGER (SEQ ID NO:16);

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO:17);

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO:21);

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO:22);

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:23);

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO:24);

HCDR8: RAN (SEQ ID NO:25);

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:26).

Аминокислотные последовательности 3 CDR-участков его переменной области легкой цепи представляют собой следующее:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO:18);

LCDR2: FTS (SEQ ID NO:19);

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO:20).

В настоящем изобретении, если не определено иное, научные и технические термины, использованные здесь, имеют значения, в которых их обычно понимают специалисты в данной области. Кроме того, лабораторные методики культивирования клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, применяемые здесь, являются стандартными методиками, широко применяемыми в соответствующих областях. В то же время, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения и разъяснения важных терминов.

При использовании здесь указание аминокислотной последовательности белка VEGFA (идентификатор в GenBank NP_001165097.1) включает полноразмерный белок VEGFA, а также слитый белок VEGFA, такой как фрагмент, слитый с Fc белковым фрагментом мышиного или человеческого IgG (mFc или hFc). Тем не менее, специалистам в данной области будет ясно, что в аминокислотной последовательности белка VEGFA возможно появление естественных или введение искусственных мутаций

или изменений (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления) без влияния на его биологические функции. Поэтому в настоящем изобретении термин «белок VEGFA» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, описание фрагмента последовательности белка VEGFA также включает соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах. В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность белка VEGFA показана как подчеркнутая часть SEQ ID NO:1 (без последних 6 His, в общей сложности 302 аминокислоты).

При использовании здесь указание аминокислотной последовательности белка VEGFR2 (также известного как KDR, идентификатор в GenBank NP_002244) включает полноразмерный белок VEGFR2, или внеклеточный фрагмент VEGFR2 VEGFR2-ECD, или фрагмент, содержащий VEGFR2-ECD, и также включает слитый белок VEGFR2-ECD, такой как фрагмент, слитый с Fc-белковым фрагментом мышиного или человеческого IgG (mFc или hFc). Тем не менее, специалистам в данной области будет ясно, что в аминокислотной последовательности белка VEGFR2 возможно появление естественных или введение искусственных мутаций или изменений (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления) без влияния на его биологические функции. Поэтому в настоящем изобретении термин «белок VEGFR2» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, описание фрагмента последовательности белка VEGFR2 также включает соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах. В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность внеклеточного фрагмента VEGFR2 VEGFR2-ECD показана как часть SEQ ID NO:4 с волнистым подчеркиванием (766 аминокислот).

При использовании здесь, если не указано иное, VEGFR представляет собой VEGFR1 и/или VEGFR2; конкретные последовательности этих белков известны из предшествующего уровня техники, и возможна ссылка на последовательности, раскрытые в существующей литературе или в GenBank. Например, VEGFR1 (VEGFR1, идентификатор в NCBI Gene 2321), VEGFR2 (VEGFR2, идентификатор в NCBI Gene 3791).

При использовании здесь указание аминокислотной последовательности белка PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток 1-го типа, идентификатор в NCBI GenBank NM_005018) включает полноразмерный белок PD-1, или внеклеточный фрагмент PD-1 PD-1-ECD, или фрагмент, содержащий PD-1-ECD, и также включает слитый белок PD-1-ECD, такой как фрагмент, слитый с Fc-белковым фрагментом мышиного или человеческого IgG (mFc или hFc). Тем не менее, специалистам в данной области будет ясно, что в аминокислотной последовательности белка PD-1 возможно появление естественных или введение искусственных мутаций или изменений (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления) без влияния на его биологические функции. Поэтому в настоящем изобретении термин «белок PD-1» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, описание фрагмента последовательности белка PD-1 также включает соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах.

При использовании здесь термин EC_{50} относится к концентрации для 50% максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может приводить к 50% максимального эффекта.

При использовании здесь термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух пар полипептидных цепей (в каждой паре есть одна «легкая» (L) цепь и одна «тяжелая» (H) цепь). В общем смысле, тяжелую цепь можно интерпретировать как полипептидную цепь антитела с большей молекулярной массой, а легкая цепь относится к полипептидной цепи антитела с меньшей молекулярной массой. Легкие цепи классифицируют как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи обычно классифицируют как μ , δ , γ , α или ϵ , а изоформы антител определяют как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область соединены «J-областью» из приблизительно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит «D-область» из приблизительно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена

C_L . Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом ($C1q$) классической системы комплемента. Области V_H и V_L могут быть дополнительно разделены на высоковариабельные области (называемые участками, определяющими комплементарность (CDR)), между которыми расположены консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (V_H и V_L) каждой пары «тяжелая цепь / легкая цепь» образуют связывающие сайты антитела, соответственно. Отнесение аминокислот к областям или доменам может быть основано на Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196(1987): 901-917, Chothia *et al. Nature* 342(1989): 878-883, или определении системы нумерации IMGT, см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." *Nucleic acids research* 38.suppl_1 (2009): D301-D307. В частности, тяжелая цепь может также содержать больше, чем 3 CDR, например 6, 9 или 12. Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению тяжелая цепь может представлять собой scFv, где C-конец тяжелой цепи антитела IgG связан с другим антителом, и в данном случае тяжелая цепь содержит 9 CDR. Термин «антитело» не ограничен каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитела могут представлять собой антитела различных изотипов, такие как антитело IgG (например, подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

При использовании здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент», также известный как «антигенсвязывающая часть», относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфично связываться с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфичное связывание с антигеном. В целом, см. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), полностью включенную сюда посредством ссылки для любых задач.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен методикой рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактного антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb и фрагмент участка, определяющего комплементарность (CDR), фрагмент одноцепочечного антитела (например, scFv), химерное антитело, диатело и полипептид, содержащий по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания полипептиду способности специфично связываться с антигеном.

При использовании здесь термин «Fd-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1}; термин «Fv-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одной ветви антитела; термин «dAb-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward *et al.*, *Nature* 341 (1989):544-546); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; и термин «F(ab')₂-фрагмент» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидной связью в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены V_L и V_H образуют пару с получением моновалентной молекулы через линкер, позволяющий им образовывать единую полипептидную цепь (см., например, Bird *et al.*, *Science* 242 (1988):423-426, и Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988):5879-5883). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH. В предшествующем уровне техники подходящий линкер состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, может быть использован линкер (GGGGS)₄, а также могут быть использованы его варианты (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993): 6444-6448). Другие линкеры, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны Alfthan *et al.*, *Protein Eng.* 8 (1995): 725-731, Choi *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001): 94-106, Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56 (1996): 3055-3061, Kipriyanov *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293 (1999): 41-56, и Roovers *et al.*, *Cancer Immunol.* (2001).

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, то есть бивалентное антитело, в котором домены V_H и V_L

экспрессированы на одной полипептидной цепи. Тем не менее, используемый линкер является слишком коротким для образования пары из двух доменов, расположенных на одной и той же цепи, что вынуждает домены образовывать пары с комплементарными доменами на другой цепи с получением двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993):6444-6448, и Poljak RJ *et al.*, *Structure* 2 (1994):1121-1123).

Антигенсвязывающие фрагменты (например, указанные выше фрагменты антител) антител могут быть получены из заданных антител с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области (например, методика рекомбинантных ДНК или ферментативное или химическое расщепление), и указанные антигенсвязывающие фрагменты антител подвергают скринингу на предмет специфичности таким же образом, как интактные антитела.

При использовании здесь, если контекстом ясно не определено иное, указание термина «антитело» включает не только интактные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты антител.

При использовании здесь термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или его фрагменту, имеющим происхождение из группы в высокой степени гомологичных антител, то есть от группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут происходить спонтанно. Моноклональное антитело имеет высокую специфичность в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело, в отличие от моноклонального антитела, обычно включает по меньшей мере два или более чем два разных антитела, которые обычно распознают разные эпитопы антигена. Моноклональные антитела могут обычно быть получены гибридомной методикой, впервые описанной Kohler *et al.* (*Nature*, 256:495, 1975), и могут также быть получены методикой рекомбинантных ДНК (например, см. патент США 4816567).

При использовании здесь термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть легкой и/или тяжелой цепи имеет происхождение из одного антитела (которое может иметь происхождение из определенного вида или принадлежать к определенному классу или подклассу антител), а другая часть легкой и/или тяжелой цепи имеет происхождение из другого антитела (которое может иметь происхождение из того же или другого вида или принадлежать к тому же или другому классу или

подклассу антител). Но в любом случае, оно сохраняет связывающую активность в отношении целевого антигена (патент США 4816567, выданный Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984):6851-6855).

При использовании здесь термин «гуманизированное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученным при замене всех или части CDR-участков человеческого иммуноглобулина (антитела-рецептора) на CDR-участки антитела, не являющегося человеческим (антитела-донора), где антитело-донор может представлять собой антитело, не являющееся человеческим (например, мышинное, крысиное или кроличье), имеющее ожидаемые специфичность, аффинность или реактивность. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки каркасных областей (FR) антитела-рецептора могут также быть заменены на аминокислотные остатки соответствующих антител, не являющихся человеческими, или на аминокислотные остатки других антител для дополнительного улучшения или оптимизации активности антитела. Более подробные сведения о гуманизированных антителах приведены, например, в Jones *et al.*, *Nature*, 321 (1986): 522-525, Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988), Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2 (1992): 593-596, и Clark, *Immunol. Today* 21 (2000): 397-402.

При использовании здесь термин «эпитоп» относится к сайту антигена, с которым специфично связываются иммуноглобулин или антитело. В данной области «эпитоп» называют также «антигенной детерминантой». Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекулы, таких как аминокислоты, или углеводы, или сахарные боковые цепи, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 расположенных друг за другом или не друг за другом аминокислот в уникальной пространственной конформации и может быть «линейным» или «конформационным». См., например, Epitope Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все сайты, принимающие участие во взаимодействии между белком и взаимодействующей с ним молекулой (например, антителом), линейно расположены в первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе сайты, принимающие участие

во взаимодействии, соответствуют аминокислотным остаткам белка, отделенным друг от друга.

При использовании здесь термин «выделенный» относится к полученному искусственным способом из естественного состояния. Если определенные «выделенные» вещество или компонент встречаются в природе, их естественное окружение может быть изменено и/или они могут быть выделены из естественного окружения. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид встречается в природе у определенного животного, а тот же полинуклеотид или полипептид с высокой степенью чистоты, выделенный из такого естественного состояния, называют выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

При использовании здесь термин «вектор» относится к нуклеиновой кислоте-носителю, в которую может быть встроен полинуклеотид. Когда вектор позволяет осуществлять экспрессию белка, кодируемого введенным полинуклеотидом, вектор называют вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции, таким образом, что элементы генетического материала, переносимого вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, имеющая происхождение от P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые могут быть использованы в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать различные элементы контроля экспрессии, включая, без ограничения, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селекционные элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

При использовании здесь термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые может быть введен вектор, включая, без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293, или человеческие клетки.

При использовании здесь термин «специфичное связывание» относится к неслучайному взаимодействию со связыванием двух молекул, такому как взаимодействие антитела с его целевым антигеном. В некоторых воплощениях антитело, специфично связывающееся с антигеном (или антитело, специфичное в отношении антигена), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (K_D) менее чем приблизительно 10^{-5} М, такой как менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. В некоторых воплощениях настоящего изобретения термин «направленное» относится к специфичному связыванию.

При использовании здесь термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации при специфичном взаимодействии антитела с антигеном, которую используют для описания аффинности связывания антитела с антигеном. Чем меньше равновесная константа диссоциации, тем прочнее связывание антитела с антигеном и тем выше аффинность антитела в отношении антигена. Обычно антитела связываются с антигенами с равновесной константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-5} М, такой как менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее, например, как определено в приборе BIAcore с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

При использовании здесь термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «PcAb» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем изобретении аминокислоты обычно обозначены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области. Например, аланин может быть обозначен как A или Ala.

При использовании здесь термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к носителю и/или наполнителю, фармакологически и/или физиологически совместимому с субъектом и активным ингредиентом, который хорошо известен в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995) и включает, без ограничения, регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и агенты, увеличивающие ионную силу. Например, регуляторы pH включают, без ограничения, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; агенты, увеличивающие ионную силу, включают, без ограничения, хлорид натрия.

При использовании здесь термин «адъювант» относится к неспецифическому иммуностимулятору, который может усиливать иммунный ответ организма на антигены или изменять тип иммунного ответа при доставке в организм вместе с антигенами или доставке в организм до доставки антигенов. Существуют различные адъюванты, включая, без ограничения, алюминийсодержащие адъюванты (такие как гидроксид алюминия), адъювант Фрейнда (такой как полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), *Corynebacterium parvum*, липополисахарид, цитокины и так далее. В экспериментах на животных чаще всего используют адъювант Фрейнда. В клинических исследованиях чаще используют гидроксид алюминия.

При использовании здесь термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или по меньшей мере частичного получения желаемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество (например, применительно к заболеванию, сопровождающемуся связыванием PD-1 с PD-L1 или сверхэкспрессией VEGF, такому как опухоль) представляет собой количество, достаточное для предотвращения, остановки или задержки начала заболевания (например, заболевания, ассоциированного со связыванием PD-1 с PD-L1 или сверхэкспрессией VEGF, такого как опухоль); терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, страдающего от заболевания. Несомненно, специалисты в данной области могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтического

применения, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния иммунной системы пациента, параметров общего состояния пациента, таких как возраст, масса тела и пол, способа введения лекарственного средства, одновременного применения других видов лечения и так далее.

Преимущества настоящего изобретения

Биспецифическое антитело VP101 может хорошо и специфично связываться с VEGFA, эффективно блокировать связывание VEGFA с VEGFR2 и специфично уменьшать иммуносупрессивное действие VEGFA в организме и стимулирующий эффект VEGFA на ангиогенез; VP101 может хорошо и специфично связываться с PD-1, эффективно блокировать связывание PD-1 с PD-L1, специфично уменьшать иммуносупрессивное действие PD-1 в организме и активировать иммунный ответ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 показаны результаты выявления бифункционального антитела VP101 посредством SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Образцы, представленные на четырех дорожках, слева направо, и соответствующие количества, в которых они были внесены, представляют собой следующее: антитело в невозстанавливающем загрузочном буфере для белкового электрофореза, 1 мкг; антитело в восстанавливающем загрузочном буфере для белкового электрофореза, 1 мкг; маркер, 5 мкл; BSA (бычий сывороточный альбумин), 1 мкг.

На ФИГ. 2 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела VP101 с PD-1.

На ФИГ. 3 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела BsAbB7 с PD-1.

На ФИГ. 4 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела BsAbB8 с PD-1.

На ФИГ. 5 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела 14C12H1L1 с PD-1.

На ФИГ. 6 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела ниволумаба с PD-1.

На ФИГ. 7 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела VP101 с VEGF.

На ФИГ. 8 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела BsAbB7 с VEGF.

На ФИГ. 9 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела BsAbB8 с VEGF.

На ФИГ. 10 показаны результаты определения характерных кинетических параметров связывания антитела бевацизумаб с VEGF.

На ФИГ. 11 показана связывающая активность антитела VP101 в отношении VEGFA, определенная непрямым ELISA.

На ФИГ. 12 показана соответствующая связывающая активность антител VP101, BsAbB7, BsAbB8 и бевацизумаб в отношении VEGFA-his, определенная непрямым ELISA.

На ФИГ. 13 показана связывающая активность антитела VP101 в отношении PD-1, определенная непрямым ELISA.

На ФИГ. 14 показана соответствующая связывающая активность антител VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и ниволумаб в отношении PD-1, определенная непрямым ELISA.

На ФИГ. 15 показана активность антитела VP101 в конкурировании с VEGFR2 при связывании с VEGFA, определенная конкурентным ELISA.

На ФИГ. 16 показана активность антитела VP101 в конкурировании с PD-L1 при связывании с PD-1, определенная конкурентным ELISA.

На ФИГ. 17 показана EC_{50} связывания антител 14C12H1L1 и VP101 с поверхностным белком PD-1 клеток 293T-PD-1, определенная посредством FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией).

На ФИГ. 18 показана EC_{50} связывания антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 с поверхностным белком PD-1 клеток 293T-PD-1, определенная посредством FACS.

На ФИГ. 19 показана активность антител VP101 и 14C12H1L1 в конкурировании с PD-L1 при связывании с поверхностным белком PD-1 клеток 293T-PD-1, определенная посредством FACS.

На ФИГ. 20 показана активность антител 14C12H1L1, VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L и ниволумаб в конкурировании с PD-L1 при связывании с поверхностным белком PD-1 клеток 293T-PD-1, определенная посредством FACS.

На ФИГ. 21 показана нейтрализующая биологическая активность антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 при блокировании активирующего действия VEGF на сигнальный путь NFAT.

На ФИГ. 22 показан эффект бевацизумаба и VP101 на пролиферацию клеток HUVEC.

На ФИГ. 23 показан эффект VP101 на секрецию IFN- γ в системе смешанной культуры DC и PBMC (моноклеарные клетки периферической крови).

На ФИГ. 24 показан эффект VP101, BsAbB7 и BsAbB8 на секрецию IFN- γ в системе смешанной клеточной культуры DC и PBMC.

На ФИГ. 25 показан эффект VP101, BsAbB7 и BsAbB8 на секрецию IL-2 в системе смешанной клеточной культуры DC и PBMC.

На ФИГ. 26 показан эффект антител 14C12H1L1 и VP101 на секрецию цитокина IL-2, индуцированную в смешанной культуре PBMC и клеток Raji-PD-L1, определенный посредством ELISA.

На ФИГ. 27 показан эффект антител 14C12H1L1 и VP101 на секрецию цитокина IFN- γ , индуцированную в смешанной культуре PBMC и клеток Raji-PD-L1, определенный посредством ELISA.

На ФИГ. 28 показан эффект антител 14C12H1L1, VP101, BsAbB7 и BsAbB8 на секрецию цитокина IFN- γ , индуцированную в смешанной культуре PBMC и клеток Raji-PD-L1, определенный посредством ELISA.

На ФИГ. 29 показан эффект антител 14C12H1L1, VP101, BsAbB7 и BsAbB8 на секрецию цитокина IL-2, индуцированную в смешанной культуре PBMC и клеток Raji-PD-L1, определенный посредством ELISA.

На ФИГ. 30 показано ингибирование опухолевого роста различными концентрациями VP101.

На ФИГ. 31 показан эффект различных концентраций VP101 на массу тела мышей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее воплощения настоящего изобретения будут подробно описаны посредством примеров. Специалистам в данной области будет ясно, что последующие примеры использованы исключительно для иллюстрирования настоящего изобретения и их не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения. В

случаях отсутствия конкретных описаний методик или условий применяли методики или условия, описанные в литературе, относящейся к данной области (например, см. *Guide to Molecular Cloning Experiments*, авторы J. Sambrook *et al.*, перевод Huang Peitang *et al.*, третье издание, Science Press), или в руководствах по применению соответствующих продуктов. При отсутствии указаний на изготовителей использованных реагентов или приборов, все эти реагенты или приборы представляли собой обычные реагенты или приборы, имеющиеся в продаже.

В последующих примерах настоящего изобретения имеющееся в продаже антитело бевацизумаб (торговое название Авастин®), направленное на ту же мишень, было приобретено у Roche в качестве контрольного антитела или было получено в соответствии с Примером получения 4.

В последующих примерах настоящего изобретения имеющееся в продаже антитело ниволумаб (торговое название Опдиво®), направленное на ту же мишень, было приобретено у BMS в качестве контрольного антитела.

В последующих примерах настоящего изобретения аминокислотные последовательности контрольных антител BsAbB7 и BsAbB8 были идентичны аминокислотным последовательностям BsAbB7 и BsAbB8, соответственно, из публикации патента Китая CN105175545A.

Пример получения 1: Получение слитых белков PD-1-mFc, PD-1-hFc и PD-L1-hFc

Получение слитых белков PD-1-mFc, PD-1-hFc и PD-L1-hFc и их выявление посредством SDS-PAGE-электрофореза проводят в полном соответствии с Примером получения 1 публикации патента Китая CN106632674A.

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности слитых белков PD-1-mFc, PD-1-hFc и PD-L1-hFc в данном примере получения идентичны соответствующим последовательностям PD-1-mFc, PD-1-hFc и PD-L1-hFc, приведенным в Примере получения 1 публикации патента Китая CN106632674A.

Таким образом были получены слитые белки PD-1-mFc, PD-1-hFc и PD-L1-hFc

Пример получения 2: Экспрессия и очистка слитого белка VEGFA-His

1. Конструирование плазмиды VEGFA-His

Проводили PCR(полимеразная цепная реакция)-амплификацию, используя кДНК (комплементарная ДНК) человеческого VEGFA (приобретенную у Origene) в

качестве матрицы, и очистку и выделение фрагмента hVEGFA-His с использованием обычного набора для выделения ДНК-продуктов. Выделенный фрагмент hVEGFA-His и вектор экспрессии pcDNA3.1 расщепляли ферментами XbaI и HindIII-HF и целевой фрагмент гена выделяли путем экстрагирования из геля и лигировали с линейным вектором экспрессии лигазой T4. Затем всеми продуктами лигирования трансформировали химически компетентные клетки DH5a и наносили их на планшет с агаром и Amp. Хорошо разделенные одиночные колонии отбирали для идентификации посредством PCR колоний, PCR-положительные клоны засеивали в культуральную среду LB для культивирования и раствор бактерий отбирали и направляли в Guangzhou Invitrogen Biotechnology для верификации секвенированием. Выравнивание последовательностей, определенных при секвенировании, показало, что последовательность, введенная в положительные клоны, была полностью верна.

2. Экспрессия и очистка слитого белка VEGFA-His

После трансфекции клеток 293F (приобретенных у Invitrogen) рекомбинантной плазмидой VEGFA-his на протяжении 7 суток в соответствии с руководством по применению набора для липофектаминовой трансфекции (приобретенного у Invitrogen) культуральную среду подвергали высокоскоростному центрифугированию, концентрированию супернатанта и замене буфера на связывающий буфер А и затем наносили на колонку HisTrap, и проводили линейное элюирование белков элюирующим буфером А. После первичной очистки образец подвергали замене буфера на связывающий буфер В с использованием обессоливающей колонки HiTrap Desalting и наносили на колонку HiTrap Q, проводили линейное элюирование белков элюирующим буфером В, выделяли целевой образец и заменяли буфер на PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор). Очищенный образец вносили в восстанавливающий загрузочный буфер для белкового электрофореза для выявления посредством SDS-PAGE-электрофореза.

Таким образом был получен слитый белок VEGFA-His.

Аминокислотная последовательность VEGFA-His представляет собой следующее (171 а/к):

APMAEGGGQNNHEVVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVP
LMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDR

ARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKSCSKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRHH
HHHH (SEQ ID NO:1),

где подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность VEGFA.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая VEGFA-His (513 п.о.):

GCACCCATGGCCGAGGGCGGCGGCCAGAACCACCACGAGGTGGTGAAGTT
CATGGACGTGTACCAGAGAAGCTACTGCCACCCCATCGAGACCCTGGTGGACATC
TTCCAGGAGTACCCCGACGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCCAGCTGCGTGCCCC
TGATGAGATGCGGCGGCTGCTGCAACGACGAGGGCCTGGAGTGCGTGCCCCACCG
AGGAGAGCAACATCACCATGCAGATCATGAGAATCAAGCCCCACCAGGGCCAGC
ACATCGGCGAGATGAGCTTCCTGCAGCACACAAGTGCGAGTGCGAGACCCAAGA
AGGACAGAGCCAGACAGGAGAACCCCTGCGGCCCCCTGCAGCGAGAGAAGAAAG
CACCTGTTCGTGCAGGACCCCCAGACCTGCAAGTGCGAGCTGCAAGAACACCGAC
AGCAGATGCAAGGCCAGACAGCTGGAGCTGAACGAGAGAACCTGCAGATGCGAC
AAGCCCAGAAGACATCATCACCATCACCAC (SEQ ID NO:2).

Пример получения 3: Экспрессия и очистка слитого белка VEGFR2-hFc

1. Синтез гена VEGFR2-hFc

Проводили слияние аминокислот, соответствующих внеклеточному фрагменту VEGFR2-ECD гена VEGFR2 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2-го типа, NP_002244 в NCBI GenBank), с TEV и Fc-белковым фрагментом человеческого IgG (hFc), соответственно (SEQ ID NO:3). Синтез соответствующей кодирующей нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO:4) был проведен Genscript.

VEGFR2, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2-го типа, NP_002244 в NCBI GenBank.

hFc: С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа P01857, 106-330.

Аминокислотная последовательность слитого белка VEGFR2-hFc (998 а/к):

MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCR
GQRDLDWLWPNQSGSEQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGAYKCFYRETDLA
SVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRF
VPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMV FCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
SPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEM
KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEA

TVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILT
 NPISKEKQSHVVSLLVYVPPQIGESLISPVDSYQYGTTQTLTCTVYAIPPPHHIHWYW
 QLEEECANEPSQAVSVTNYPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTL
 VIQAANVSALYKCEAVNKKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMPQTEQESVSLWCTAD
 RSTFENLTWYKLGPOPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNA
 SLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTA
 SGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVKEDEGLYTCQACSVLGCAC
 VEAFFIIEGAQEKTNLESRE^{ENLYFQG}THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:3),

где часть с волнистым подчеркиванием представляет собой ECD-часть VEGFR2, часть, заключенная в рамку, представляет собой сайт ферментативного расщепления TEV, а часть со сплошным подчеркиванием представляет собой часть hFc.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок VEGFR2-hFc (2997 п.о.):

ATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGGCCGTCGCCCTGTGGCTCTGCGTGGAGAC
 CCGGGCCGCCTCTGTGGGTTTGCCTAGTGTTTCTCTTGATCTGCCCAGGCTCAGCA
 TACAAAAAGACATACTTACAATTAAGGCTAATACAACCTCTTCAAATTACTTGCAG
 GGGACAGAGGGACTTGGACTGGCTTTGGCCCAATAATCAGAGTGGCAGTGAGCA
 AAGGGTGGAGGTGACTGAGTGCAGCGATGGCCTCTTCTGTAAGACACTCACAAAT
 CCAAAAGTGATCGGAAATGACACTGGAGCCTACAAGTGCTTCTACCGGGAAACT
 GACTTGGCCTCGGTCATTTATGTCTATGTTCAAGATTACAGATCTCCATTTATTGC
 TTCTGTTAGTGACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAGAACAAAAACAAAAC
 GTGGTGATTCCATGTCTCGGGTCCATTTCAAATCTCAACGTGTCACTTTGTGCAAG
 ATACCCAGAAAAAGAGATTTGTTCTGATGGTAACAGAATTTCTGGGACAGCAAG
 AAGGGCTTTACTATTCCCAGCTACATGATCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGA
 AGCAAAAATTAATGATGAAAGTTACCAGTCTATTATGTACATAGTTGTCGTTGTA
 GGGTATAGGATTTATGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGT
 TGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATT
 GACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACC

GAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAA
CTATAGATGGTGTAACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAG
TGGGCTGATGACCAAGAAGAAGACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAACCTTTT
GTTGCTTTTGGAAAGTGGCATGGAATCTCTGGTGGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTG
TCAGAATCCCTGCGAAGTACCTTGGTTACCCACCCCCAGAAATAAAATGGTATAA
AAATGGAATACCCCTTGAGTCCAATCACACAATTAAAGCGGGGCATGTACTGACG
ATTATGGAAGTGAGTGAAAGAGACACAGGAAATTACACTGTCATCCTTACCAATC
CCATTTCAAAGGAGAAGCAGAGCCATGTGGTCTCTCTGGTTGTGTATGTCCCACC
CCAGATTGGTGAGAAATCTCTAATCTCTCCTGTGGATTCCTACCAGTACGGCACC
ACTCAAACGCTGACATGTACGGTCTATGCCATTCTCCCCCGCATCACATCCACTG
GTATTGGCAGTTGGAGGAAGAGTGCGCCAACGAGCCCAGCCAAGCTGTCTCAGT
GACAAACCCATACCCTTGTGAAGAATGGAGAAGTGTGGAGGACTTCCAGGGAGG
AAATAAAATTGAAGTTAATAAAAAATCAATTTGCTCTAATTGAAGGAAAAAACA
AACTGTAAGTACCCTTGTTATCCAAGCGGCAAATGTGTCAGCTTTGTACAAATGT
GAAGCGGTCAACAAAGTCGGGAGAGGAGAGAGGGTGATCTCCTTCCACGTGACC
AGGGGTCCTGAAATTACTTTGCAACCTGACATGCAGCCCACTGAGCAGGAGAGC
GTGTCTTTGTGGTGCACTGCAGACAGATCTACGTTTGAGAACCTCACATGGTACA
AGCTTGGCCACAGCCTCTGCCAATCCATGTGGGAGAGTTGCCACACCTGTTTG
CAAGAACTTGGATACTCTTTGGAAATTGAATGCCACCATGTTCTCTAATAGCACA
AATGACATTTTGATCATGGAGCTTAAGAATGCATCCTTGCAGGACCAAGGAGACT
ATGTCTGCCTTGCTCAAGACAGGAAGACCAAGAAAAGACATTGCGTGGTCAGGC
AGCTCACAGTCCTAGAGCGTGTGGCACCCACGATCACAGGAAACCTGGAGAATC
AGACGACAAGTATTGGGGAAAGCATCGAAGTCTCATGCACGGCATCTGGGAATC
CCCCTCCACAGATCATGTGGTTTAAAGATAATGAGACCCTTGTAGAAGACTCAGG
CATTGTATTGAAGGATGGGAACCGGAACCTCACTATCCGCAGAGTGAGGAAGGA
GGACGAAGGCCTCTACACCTGCCAGGCATGCAGTGTTCTTGGCTGTGCAAAAGTG
GAGGCATTTTTCATAATAGAAGGTGCCCAGGAAAAGACGAACTTGGAATCTAGA
GAAAACCTGTATTTTCAGGGCACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT

CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCC
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA

(SEQ ID NO:4),

где часть с волнистым подчеркиванием представляет собой ECD-часть VEGFR2, часть, заключенная в рамку, представляет собой сайт ферментативного расщепления TEV, а часть со сплошным подчеркиванием представляет собой часть hFc.

2. Конструирование плазмиды pUC57simple-VEGFR2-hFc

Ген, кодирующий VEGFR2-hFc, синтезированный Genscript, клонировали в вектор экспрессии pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением плазмиды pUC57simple-VEGFR2-hFc.

3. Конструирование рекомбинантной плазмиды pcDNA3.1-VEGFR2-hFc

Плазмиду pUC57simple-VEGFR2-hFc расщепляли ферментами (XbaI и BamHI), и фрагмент слитого гена VEGFR2-hFc, выделенный посредством электрофореза, лигировали с вектором экспрессии pcDNA3.1 (приобретенным у Invitrogen) с получением pcDNA3.1-VEGFR2-hFc, которой трансфицировали компетентные клетки *E. coli* DH5a (приобретенные у TIANGEN); трансфекцию и культивирование проводили, следуя руководствам. Проводили скрининг на предмет pcDNA3.1-VEGFR2-hFc-положительных колоний, *E. coli* амплифицировали обычным методом, после чего использовали набор (приобретенный у Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd., DP103-03) и выделяли рекомбинантную плазмиду pcDNA3.1-VEGFR2-hFc, следуя руководству по применению набора.

4. Трансфекция клеток 293F рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1-VEGFR2-hFc

Клетки 293F (приобретенные у Invitrogen) трансфицировали рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1-VEGFR2-hFc с использованием набора для липофектаминавой трансфекции (приобретенного у Invitrogen).

5. Выявление белка VEGFR2-hFc посредством SDS-PAGE-электрофореза

После трансфекции клеток 293F рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1-VEGFR2-hFc на протяжении 7 суток культуральную среду подвергали высокоскоростному центрифугированию, вакуумной фильтрации через микропористую мембрану и очистке в колонке Mabselect SuRe с получением образца слитого белка VEGFR2-hFc и часть образца вносили в восстанавливающий загрузочный буфер для белкового электрофореза для выявления посредством SDS-PAGE-электрофореза.

Таким образом был получен слитый белок VEGFR2-hFc.

Пример получения 4: Получение антитела бевацизумаб против VEGFA

Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи имеющегося в продаже моноклонального антитела к VEGFA Авастин (бевацизумаб) приведены в публикации патента Китая CN1259962A. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, были синтезированы Genscript.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи бевацизумаба (123 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI
NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH
WYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:5).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи бевацизумаба (369 п.о.):

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTC
TCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAAT
TGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACT
TACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCC
TGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGG
ACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTG
GTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC
(SEQ ID NO:6).

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи бевацизумаба (107 а/к):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
HSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:7).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи бевацизумаба (321 п.о.):

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAATTGGT
ATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCT
GCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACT
CTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTA
TTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG
(SEQ ID NO:8).

Все константные области тяжелой цепи представляли собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа P01857; все константные области легкой цепи представляли собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи бевацизумаба клонировали в вектор pсDNA3.1 с получением рекомбинантной экспрессионной плазмиды антитела бевацизумаб. Полученной рекомбинантной плазмидой трансфицировали клетки 293F. Культуральную среду клеток 293F очищали и затем проводили выявление.

Таким образом было получено моноклональное антитело против VEGFA Авастин (бевацизумаб).

Пример получения 5: Получение и выявление гуманизированного антитела против PD-1 14C12H1L1

Получение проводили в соответствии с Примерами 3-4, описанными в публикации патента Китая CN106977602A.

Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1 и кодирующие их нуклеотидные последовательности также идентичны последовательностям, описанным в Примерах 3-4 публикации патента Китая CN106977602A, и приведены здесь следующим образом.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1 (118 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAY
WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:9).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1 (354 п.о.):

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTC
ACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCT
GGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAG
AGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGA
CACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGG
GGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO:10).

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1 (107 а/к):

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO:11).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1 (321 п.о.):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGT
TTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGAC
TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACAC
TCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAG
TATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAG
(SEQ ID NO:12).

Таким образом было получено гуманизированное антитело против PD-1 14C12H1L1.

Пример получения 6: Получение и идентификация hIgG

Последовательность человеческого IgG против лизоцима куриного яйца (то есть человеческого IgG против HEL, сокращенно hIgG) имеет происхождение от последовательности переменной области Fab последовательности F10.6.6 из

исследования, опубликованного Acierno *et al.* под названием «Созревание аффинности повышает стабильность и пластичность Fv-домена противобелковых антител» ("Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies") (Acierno *et al.*, *J Mol Biol.* 2007; 374(1): 130-46). Методика получения представляет собой следующее.

Оптимизация кодонов аминокислот и синтез генов тяжелой и легкой цепи (полноразмерных последовательностей или варьируемых областей) были проведены Nanjing Genscript Biology, и с учетом стандартных методик, приведенных в «Руководстве по экспериментам молекулярного клонирования (третье издание)» ("Guide to Molecular Cloning Experiments (Third Edition)"), и с использованием стандартных методик молекулярного клонирования, таких как PCR, ферментативное расщепление, выделение ДНК из геля, лигирование, трансформация, PCR колоний или идентификация посредством ферментативного расщепления, гены тяжелой и легкой цепи субклонировали в вектор экспрессии тяжелой цепи антитела и вектор экспрессии легкой цепи антитела, соответственно, системы экспрессии в клетках млекопитающих и проводили дальнейшее секвенирование и анализ генов тяжелой и легкой цепи в рекомбинантных векторах экспрессии. После верификации правильности последовательности проводили крупномасштабное получение экспрессионных плазмид, свободных от эндотоксина, и транзиторную котрансфекцию клеток HEK293 полученными плазмидами тяжелой и легкой цепи для экспрессии рекомбинантного антитела. После 7 суток культивирования собирали культуральную среду, подвергали ее аффинной очистке с использованием колонки с рекомбинантным белком А (rProtein A) (GE) и качество полученного образца антитела оценивали с использованием стандартных аналитических методик SDS-PAGE и SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография).

Таким образом был получен hIgG, использованный в описанных ниже Примерах 8-9.

Пример 1: Разработка последовательностей, получение и выявление тяжелой и легкой цепей бифункционального антитела VP101

1. Разработка последовательностей

По структуре бифункциональное антитело VP101 по настоящему изобретению представляет собой форму Morrison (IgG-scFv), то есть каждый из С-концов двух

тяжелых цепей антитела IgG связан с scFv-фрагментом другого антитела, и основной состав тяжелой и легкой цепей показан в Таблице 1 ниже.

Таблица 1: Состав тяжелой и легкой цепей VP101

№ бифункционального антитела	Тяжелая цепь			Легкая цепь
	IgG-часть	Линкерный фрагмент	scFv-часть	
VP101	Бевацизумаб-Н	Линкер-1	14C12H1 _V – Линкер-1 – 14C12L1 _V	Бевацизумаб-L

В Таблице 1 выше:

(1) отмеченное «V» в нижнем правом углу относится к вариабельной области соответствующей тяжелой цепи или вариабельной области соответствующей легкой цепи; в случае отсутствия отметки «V» соответствующая тяжелая или легкая цепь представляет собой полноразмерную цепь, содержащую константную область; аминокислотные последовательности этих вариабельных областей или полноразмерных цепей и кодирующие их нуклеотидные последовательности приведены как соответствующие последовательности, описанные выше в примерах получения;

(2) аминокислотная последовательность линкера-1 представляет собой GGGGSGGGGSGG GGS GGGGS (SEQ ID NO:13).

2. Экспрессия и очистка антитела VP101

Каждую из последовательности кДНК тяжелой цепи и последовательности кДНК легкой цепи VP101 клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением плазмид pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L, соответственно.

Плазмиды pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L расщепляли ферментами (HindIII и EcoRI), и тяжелую и легкую цепи, выделенные посредством электрофореза, субклонировали в вектор pcDNA3.1 и рекомбинантные плазмиды выделяли и использовали для котрансфекции клеток 293F. После 7 суток культивирования клеток культуральную среду центрифугировали на высокой скорости, супернатант концентрировали и наносили на колонку HiTrap MabSelect SuRe. Затем

белок элюировали за одну стадию элюирующим буфером, выделяли образец целевого антитела VP101 и заменяли буфер на PBS.

2. Выявление антитела VP101

Очищенный образец вносили как в восстанавливающий загрузочный буфер для белкового электрофореза, так и в невосстанавливающий загрузочный буфер для белкового электрофореза и затем подвергали кипячению для выявления посредством SDS-PAGE-электрофореза. Электрофореграмма VP101 показана на ФИГ. 1. В восстановленном белковом образце масса целевых белков составляет 75 кДа и 25 кДа, а в невосстановленном белковом образце масса целевого белка (целого антитела) составляет 200 кДа.

Если не указано иное, гуманизированное антитело VP101, использованное в последующих экспериментах, было получено методом, описанным в данном примере.

Пример 2: Определение кинетических параметров гуманизированного антитела VP101

1. Определение кинетических параметров связывания гуманизированного антитела VP101 с PD-1-mFc

Буфер для разведения образцов представлял собой PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). Антитело, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре АНС с высотой иммобилизации приблизительно 0,4 нМ. Сенсор уравнивали в буфере на протяжении 60 с и проводили связывание антитела, иммобилизованного на сенсоре, с PD-1-mFc в концентрации 0,62-50 нМ (трехкратный градиент разведения) на протяжении 120 с с последующей диссоциацией антигена и антитела в буфере на протяжении 300 с. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности. Программное обеспечение для сбора данных представляло собой Fortebio Data Acquisition 7.0, а программное обеспечение для анализа данных представляло собой Fortebio Data Analysis 7.0. Кинетические параметры связывания антител VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и контрольного антитела ниволумаб с PD-1-mFc показаны в Таблице 2, а результаты определения характерных кинетических параметров показаны на ФИГ. 2, ФИГ. 3, ФИГ. 4, ФИГ. 5 и ФИГ. 6, соответственно.

Таблица 2: Кинетические параметры связывания гуманизированного антитела VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и контрольного антитела ниволумаб с PD-1-mFc

Идентификатор образца	K_D (М)	k_{on} (1/Мс)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/с)	SE (k_{dis})	R_{max} (нМ)
VP101	1,68E-10	3,22E+05	1,44E+04	5,40E-05	3,16E-05	0,14-0,28
BsAbB7	1,62E-10	3,27E+05	2,60E+04	5,30E-05	6,24E-05	0,01-0,11
BsAbB8	4,06E-10	3,39E+05	2,04E+04	1,37E-04	4,61E-05	0,01-0,13
14C12H1L1	1,64E-10	4,55E+05	1,61E+04	7,47E-05	2,98E-05	0,24-0,28
Ниволумаб	2,32E-10	5,85E+05	2,03E+04	1,36E-04	3,47E-05	0,02-0,14

K_D представляет собой константу аффинности; k_{on} представляет собой скорость связывания антигена и антитела; k_{dis} представляет собой скорость диссоциации антигена и антитела; $K_D = k_{dis}/k_{on}$.

Представленные результаты показывают, что антитела VP101 и BsAbB7 эквивалентны по аффинности в отношении PD-1-mFc; константа аффинности VP101 в отношении PD-1-mFc существенно меньше, чем у BsAbB8, указывая на то, что VP101 обладает лучшей связывающей активностью; константа скорости диссоциации VP101 и PD-1-mFc была существенно меньше, чем у BsAbB8 и 14C12H1L1, указывая на более стабильное связывание VP101 с антигеном с меньшей скоростью диссоциации, чем у 14C12H1L1 и BsAbB8.

2. Определение кинетических параметров связывания гуманизированного антитела VP101 с VEGF-His

Буфер для разведения образцов представлял собой PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). VEGF-His, 1 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре HIS1K на протяжении 20 с, затем сенсор уравнивали в буфере на протяжении 60 с и проводили связывание VEGF, иммобилизованного на сенсоре, с антителом в концентрации 12,34-1000 нМ (трехкратный градиент разведения) на протяжении 120 с с последующей диссоциацией антигена и антитела в буфере на протяжении 300 с. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности. Программное обеспечение для сбора данных представляло собой

Fortebio Data Acquisition 7.0, а программное обеспечение для анализа данных представляло собой Fortebio Data Analysis 7.0.

Кинетические параметры связывания антител VP101, BsAbB7, BsAbB8, и контрольного антитела бевацизумаб с VEGF-His показаны в Таблице 3, а результаты определения характерных кинетических параметров показаны на ФИГ. 7, ФИГ. 8, ФИГ. 9 и ФИГ. 10, соответственно.

Таблица 3: Кинетические параметры связывания антител VP101, BsAbB7, BsAbB8 и контрольного антитела бевацизумаб с VEGF-His

Идентификатор образца	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101	5,21E-10	1,55E+05	9,67E+03	8,05E-05	4,66E-05	0,39-0,60
BsAbB7	5,14E-10	1,57E+05	9,67E+03	8,05E-05	4,83E-05	0,36-0,53
BsAbB8	6,33E-10	1,71E+05	1,07E+04	1,08E-04	4,64E-05	0,39-0,56
Бевацизумаб	7,24E-10	1,23E+05	7,09E+03	8,90E-05	4,53E-05	0,29-0,41

Представленные результаты показывают, что антитела VP101 и BsAbB7 эквивалентны по аффинности в отношении антигена и константа аффинности VP101 существенно меньше, чем у BsAbB8 и контрольного антитела бевацизумаб, указывая на то, что VP101 обладает лучшей связывающей активностью; константа скорости диссоциации VP101 применительно к VEGF-His существенно меньше, чем у BsAbB8, указывая на более стабильное связывание VP101 с антигеном с меньшей скоростью диссоциации, чем у BsAbB8.

Пример 3: Определение связывающей активности антитела VP101 в отношении антигена посредством ELISA

1. Определение связывающей активности антитела VP101 в отношении антигена VEGFA-His посредством непрямого ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали VEGFA-His и инкубировали при 37°C на протяжении 2 часов. После промывки микропланшет блокировали с использованием 1%-го BSA на протяжении 2 часов. После промывки в микропланшет добавляли градиентно разведенное антитело и инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки в микропланшет добавляли рабочий раствор меченого ферментом

вторичного козьего антитела против человеческого IgG и инкубировали на протяжении 30 минут при 37°C. После промывки в микропланшет добавляли хромогенный раствор ТМВ для проявления окраски на протяжении 5 минут в отсутствие света и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения хромогенной реакции. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD (оптическая плотность) в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм. Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Результат определения связывания антитела VP101 с антигеном VEGFA-His показан на ФИГ. 11. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 4. EC_{50} связывания антитела рассчитывали подбором кривых с использованием концентрации антитела в качестве абсциссы и значения поглощения в качестве ординаты, и результаты показаны в Таблице 4 ниже.

Таблица 4: Связывание бифункционального антитела с VEGFA-His (непрямой ELISA)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Сорбируемый антиген: VEGFA-His (1 мкг/мл)			
	VP101		Бевацизумаб	
1,0000	3,045	2,943	2,798	2,974
0,3333	3,037	2,861	2,816	2,993
0,1111	2,901	2,689	2,653	2,700
0,0370	2,597	2,460	2,445	2,555
0,0123	2,013	1,914	1,998	2,074
0,0041	1,115	1,086	1,446	1,363
0,0014	0,524	0,496	0,640	0,729
0,0000	0,099	0,091	0,094	0,083
Вторичное антитело	Козье антитело против человеческого IgG (H+L), HRP (1:5000)			
EC_{50} (нМ)	0,036		0,035	

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 способно эффективно связываться с белком VEGFA, что эффективность его связывания зависит от дозы и что эти два антитела эквивалентны по связывающей активности в отношении человеческого VEGFA.

2. Определение соответствующей связывающей активности антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 в отношении антигена VEGFA-His посредством непрямого ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали VEGFA-His и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки микропланшет блокировали с использованием 1%-го BSA (растворенного в PBS) на протяжении 2 часов. После промывки в микропланшет добавляли градиентно разведенное антитело и инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки в микропланшет добавляли рабочий раствор козьего антитела против Fc человеческого IgG, меченного пероксидазой хрена (Jackson, 109-035-098), и инкубировали на протяжении 30 минут при 37°C. После промывки в микропланшет добавляли TMB (Neogen, 308177) для проявления окраски на протяжении 5 минут в отсутствие света и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения хромогенной реакции. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм. Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Результат связывания антитела VP101 с антигеном VEGFA-His показан на ФИГ. 12. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 5. EC₅₀ связывания антитела рассчитывали подбором кривых с использованием концентрации антитела в качестве абсциссы и значения поглощения в качестве ординаты, и результаты показаны в Таблице 5 ниже.

Таблица 5: Соответствующая связывающая активность VP101, BsAbB7, BsAbB8 и бевацизумаба в отношении VEGFA-His (непрямой ELISA)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Сорбируемый антиген: VEGFA-His, 1 мкг/мл							
	VP101		BsAbB7		BsAbB8		Бевацизумаб	
1,000	3,112	3,090	3,074	3,081	3,070	3,093	3,137	3,138
0,333	3,026	2,961	2,954	2,941	2,946	2,968	3,075	3,086
0,111	2,802	2,684	2,575	2,621	2,631	2,618	2,965	2,999
0,037	1,972	1,876	1,656	1,668	1,756	1,709	2,504	2,503
0,012	0,994	0,915	0,754	0,764	0,809	0,814	1,476	1,454
0,004	0,436	0,391	0,317	0,332	0,347	0,339	0,711	0,700

0,001	0,197	0,177	0,151	0,155	0,159	0,155	0,318	0,311
0	0,083	0,063	0,086	0,076	0,095	0,072	0,066	0,064
Вторичное антитело	Козье антитело против Fc человеческого IgG, меченное пероксидазой хрена, HRP (1:5000)							
EC ₅₀ (нМ)	0,130		0,171		0,159		0,092	

Представленные результаты показывают, что антитела VP101, BsAbB7, BsAbB8 и бевацизумаб могут эффективно связываться с белком VEGF, что эффективность их связывания зависит от дозы и что антитело VP101 имеет более высокую связывающую активность в отношении человеческого VEGF, чем BsAbB7 и BsAbB8.

3. Определение связывающей активности антитела VP101 в отношении антигена PD-1 посредством непрямого ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали человеческий PD-1-mFc и инкубировали в течение ночи при 4°C. После блокирования 1%-м BSA при 37°C на протяжении 2 часов в микропланшет добавляли антитело и затем инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки и осушения микропланшета добавляли вторичное козье антитело против человеческого IgG (H+L), меченное HRP (Jackson, 109-035-088), и микропланшет инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки и осушения микропланшета добавляли TMB (Neogen, 308177) для проявления окраски на 5 минут и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения проявления окраски. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм. Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Результат определения связывания антитела VP101 с антигеном PD-1 показан на ФИГ. 13. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 6. По результатам количественного анализа связанного антитела VP101 проводили имитацию кривых с получением эффективности связывания антитела (EC₅₀), которая показана в Таблице 6 ниже.

Таблица 6: Связывание бифункционального антитела с PD-1 (непрямой ELISA)

Градиент разведения антитела	Сорбируемый антиген: PD-1-mFc, 0,5 мкг/мл					
	VP101		Ниволумаб		14C12H1L1	
0,333 мкг/мл	3,109	3,063	3,137	3,130	3,298	3,278
1:3	3,016	2,926	3,139	3,140	3,245	3,352
1:9	2,461	2,513	2,802	2,758	3,104	3,155
1:27	1,638	1,675	1,949	1,810	2,352	2,549
1:81	0,787	0,791	0,933	0,990	1,382	1,421
1:243	0,301	0,656	0,348	0,375	0,612	0,596
1:729	0,136	0,145	0,159	0,162	0,253	0,247
0	0,068	0,056	0,053	0,053	0,053	0,053
EC ₅₀ (нМ)	0,06		0,061		0,037	

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 способно эффективно связываться с белком PD-1 и что эффективность его связывания зависит от дозы.

4. Определение соответствующей связывающей активности антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 в отношении антигена PD-1 посредством непрямого ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали человеческий PD-1-mFc и инкубировали в течение ночи при 4°C. После блокирования 1%-м BSA при 37°C на протяжении 2 часов в микропланшет добавляли антитело и затем инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки и осушения микропланшета добавляли козье антитело против Fc человеческого IgG, меченное пероксидазой хрена (Jackson, 109-035-098), и микропланшет инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки и осушения микропланшета добавляли TMB (Neogen, 308177) для проявления окраски на 5 минут и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения проявления окраски. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм. Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Результат определения связывания антитела VP101 с антигеном PD-1 показан на ФИГ. 14. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 7. По результатам количественного анализа связанного антитела VP101 проводили имитацию кривых с получением эффективности связывания антитела (EC_{50}), которая показана в Таблице 7 ниже.

Таблица 7: Соответствующая связывающая активность антител VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и ниволумаб в отношении PD-1 (непрямой ELISA)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Сорбируемый антиген: PD-1-mFc, 0,5 мкг/мл									
	VP101		BsAbB7		BsAbB8		14C12H1L1		Ниволумаб	
0,333	2,717	2,709	2,732	2,755	2,716	2,715	2,947	2,966	2,823	2,824
0,111	2,507	2,381	2,318	2,321	2,377	2,409	2,923	2,967	2,747	2,758
0,037	1,709	1,616	1,491	1,457	1,522	1,549	2,656	2,694	2,208	2,293
0,012	0,916	0,822	0,732	0,711	0,797	0,775	2,049	2,060	1,348	1,389
0,004	0,413	0,394	0,333	0,321	0,368	0,351	1,139	1,132	0,629	0,638
0,001	0,195	0,191	0,167	0,174	0,181	0,174	0,552	0,541	0,295	0,295
0,000	0,140	0,123	0,110	0,103	0,117	0,118	0,254	0,248	0,152	0,157
0,000	0,099	0,095	0,089	0,074	0,100	0,081	0,083	0,075	0,078	0,084
Вторичное антитело	Козье антитело против Fc человеческого IgG, меченное пероксидазой хрена, HRP (1:5000)									
EC_{50} (нМ)	0,146		0,199		0,173		0,045		0,095	

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может эффективно связываться с белком PD-1, что эффективность его связывания зависит от дозы и что антитело VP101 имеет более высокую связывающую активность в отношении человеческого PD-1, чем BsAbB7 и BsAbB8.

5. Определение активности антитела VP101 в конкуритровании с VEGFR2 при связывании с антигеном VEGFA посредством конкурентного ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали VEGF-His и инкубировали при 37°C на протяжении 2 часов. После промывки микропланшет блокировали с использованием 1%-го BSA на протяжении 1 часа при 37°C. После промывки в микропланшет добавляли градиентно разведенные антитела и человеческий VEGFR2-ECD-mFc-bio

(конечная концентрация 0,02 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 2 часов. После промывки в микропланшет добавляли рабочий раствор стрептавидина, меченного HRP (SA-HRP, 1:4000) и инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки в микропланшет добавляли хромогенный раствор ТМВ для проявления окраски на протяжении 5 минут в отсутствие света и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения хромогенной реакции. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм. Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Полученные результаты показаны на ФИГ. 15. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 8. По результатам количественного анализа значений оптической плотности связанных антител проводили имитацию кривых с получением эффективности связывания антител (EC_{50} , Таблица 8).

Таблица 8: Определение конкурирования антител с VEGFR2-mFc за связывание с антигеном VEGFA-His посредством конкурентного ELISA

Сорбируемый антиген: VEGF-His (2 мкг/мл)				
Концентрация антитела (мкг/мл)	VP101		Бевацизумаб	
10,000	0,133	0,133	0,103	0,104
3,333	0,161	0,149	0,114	0,109
1,111	0,624	0,563	0,374	0,351
0,370	1,055	1,051	0,905	0,982
0,123	1,059	1,075	0,964	1,049
0,041	1,137	1,068	1,062	1,141
0,014	1,106	1,138	1,010	1,169
0,000	1,155	1,131	1,173	1,153
Рецептор	VEGFR2-ECD-mFc-bio, 0,02 мкг/мл			
Вторичное антитело	SA-HRP (1:4000)			
EC_{50} (нМ)	5,324		5,086	

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может эффективно связываться с антигеном VEGFA и ингибировать связывание VEGFR2 с

VEGFA и что его эффективность применительно к ингибированию связывания VEGFR2 с VEGFA зависит от дозы.

6. Определение конкурирования антитела VP101 с PD-L1 за связывание с антигеном PD-1 посредством конкурентного ELISA

Применяли следующий метод.

На микропланшет сорбировали PD-1-hFc и инкубировали в течение ночи при 4°C. После блокирования микропланшета 1%-м BSA на протяжении 2 часов каждое из антител в различных концентрациях смешивали с PD-L1-hFc на протяжении 10 минут (концентрации разведений указаны в Таблице 10). После инкубирования при 37°C на протяжении 30 минут микропланшет промывали и осушали. Затем добавляли меченное ферментом вторичное антитело и микропланшет инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. После промывки и осушения микропланшета добавляли ТМВ для проявления окраски на 5 минут и затем добавляли останавливающий раствор для прекращения проявления окраски. Сразу после этого микропланшет помещали в считывающее устройство и значение OD в каждой лунке микропланшета считывали при 450 нм (см. Таблицу 10). Для анализа и обработки данных использовали SoftMax Pro 6.2.1.

Полученные результаты показаны на ФИГ. 16. Значения интенсивности поглощения при каждой дозе показаны в Таблице 9. По результатам количественного анализа связанного антитела VP101 проводили имитацию кривых с получением эффективности связывания антитела (EC_{50}) (Таблица 9).

Таблица 9: Определение конкурирования бифункционального антитела с PD-L1 за связывание с PD-1 посредством конкурентного ELISA

Градиент разведения антитела	Сорбируемый антиген: PD-1-hFc, 0,5 мкг/мл					
	VP101		Ниволумаб		14C12H1L1	
5 мкг/мл	0,096	0,063	0,058	0,058	0,062	0,063
1:3	0,064	0,077	0,059	0,059	0,061	0,064
1:9	0,166	0,160	0,061	0,062	0,066	0,071
1:27	0,867	0,848	0,284	0,335	0,262	0,193
1:81	1,217	1,149	0,973	1,007	0,968	0,882
1:243	1,196	1,949	1,139	1,144	1,122	1,051

1:729	1,183	1,250	1,127	1,185	1,052	1,059
0	1,153	1,276	0,960	1,071	1,027	1,024
Рецептор	PD-L1-mFc, 0,3 мкг/мл					
Вторичное антитело	Козье антитело против мышинового IgG (H+L), конъюгированное с HRP (1:5000)					
EC ₅₀ (нМ)	1,216	0,842	0,745			

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может эффективно связываться с антигеном PD-1 и ингибировать связывание лиганда PD-L1 с PD-1 и что его эффективность в ингибировании связывания PD-L1 с PD-1 зависит от дозы.

Пример 4: Связывание антитела VP101 с поверхностным антигеном клеточной мембраны

Сначала конструировали клетки 293Т, экспрессирующие антиген PD-1, и затем проводили анализ и верификацию способности антитела специфично связываться с поверхностным антигеном клеточной мембраны посредством проточной цитометрии.

1. Конструирование клеток 293Т, экспрессирующих антиген PD-1

Клетки 293Т трансфицировали PD-1-вектором pLenti6.3-PD-1 (вектор pLenti6.3 приобретали у Invitrogen) и посредством скрининга получали клональные группы клеток 293Т-PD-1, стабильно экспрессирующих PD-1.

2. Определение связывания антитела с антигеном клеточной поверхности

293Т-PD-1, экспрессирующие антиген, полученные на предыдущей стадии, расщепляли панкреатином, применяя обычный метод панкреатинowego расщепления, и число клеток в каждой пробирке довели до 2×10^5 . Каждый из разведенных растворов антител с градиентным снижением концентрации разведением в PBSA (1% BSA) инкубировали с клетками 293Т-PD-1 на льду на протяжении 2 часов, затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл козьего антитела против человеческого IgG с FITC (1:500) и инкубировали на льду на протяжении 1 часа. Затем проводили промывку с использованием PBS, ресуспендировали клетки в 300 мкл PBSA и считывали флуоресцентные сигналы (MFI) с применением FITC-канала проточного цитометра.

Результаты показаны на ФИГ. 17, и значения MFI при каждой концентрации показаны в Таблице 10. По результатам количественного анализа флуоресценции и

подбора кривых связанного антитела 14C12H1L1 было рассчитано, что EC_{50} связывания антитела VP101 составляла 3,5 нМ.

Таблица 10: Анализ интенсивности флуоресценции при связывании VP101 с поверхностным антигеном 293T-PD-1, определенной посредством FACS

Антитело (нМ)	0,14	0,41	1,23	3,70	11,11	33,33	100	EC_{50}
Бевацизумаб	3,2	2,2	2,0	2,3	2,7	3,8	5,7	–
Ниволумаб	33,3	74,9	171,9	357,9	481,9	498,3	478,4	2,1
14C12H1L1	48,1	99,7	201,5	409,0	600,2	655,4	670,8	2,9
VP101	30,8	61,8	135,7	286,9	487,7	534,0	528,6	3,5

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может эффективно связываться с антигеном PD-1 на поверхности клеток-хозяев 293T-PD-1 и эффективность его связывания зависит от дозы, а бевацизумаб не обладает связывающей активностью в отношении 293T-PD-1, что указывает на специфичность связывания VP101 с 293T-PD-1.

3. Связывание антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 с антигеном клеточной поверхности определяли с применением экспериментальной методики, описанной на стадии 2 данного примера.

Результаты показаны на ФИГ. 18, и значения MFI при каждой концентрации показаны в Таблице 11. По результатам количественного анализа флуоресценции и подбора кривых связанного антитела было рассчитано, что значения EC_{50} связывания ниволумаба, 14C12H1L1, VP101, BsAbB7 и BsAbB8 составляли 7,853 нМ, 3,607 нМ, 7,896 нМ, 9,943 нМ и 10,610 нМ, соответственно.

Таблица 11: Анализ интенсивности флуоресценции при связывании VP101, BsAbB7 и BsAbB8 с поверхностным антигеном 293T-PD-1, определенной посредством FACS

Антитело (нМ)	0,014	0,14	0,41	1,23	3,7	11	30	100	EC_{50} (нМ)
Бевацизумаб	1,89	1,90	2,20	1,92	2,04	2,48	2,80	2,43	–
Ниволумаб	3,91	15,30	34,69	94,04	234,34	533,63	640,15	804,69	7,853
14C12H1L1	7,40	29,55	69,16	175,54	422,53	868,45	831,27	813,58	3,607
VP101	3,47	16,16	38,75	93,08	216,76	509,23	810,37	783,58	7,896
BsAbB7	3,85	14,86	37,45	83,78	202,40	465,10	837,61	846,80	9,943
BsAbB8	4,41	16,77	36,86	89,89	210,40	457,91	804,43	863,35	10,610

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может связываться с PD-1 на поверхности мембраны 293T-PD-1 дозозависимым образом. Бевацизумаб не обладает связывающей активностью в отношении 293T-PD-1, что указывает на специфичность связывания VP101 с 293T-PD-1.

Пример 5: Конкурентное связывание антитела VP101 с поверхностным антигеном клеточной мембраны

1. Для определения EC_{50} VP101 при конкурировании с PD-L1 за связывание с поверхностным антигеном клеточной мембраны PD-1, применяли следующий конкурентный проточно-цитометрический метод.

Клетки 293T-PD-1 расщепляли обычным способом и разделяли на несколько образцов по 300000 клеток в каждом, которые затем центрифугировали и промывали. Затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл соответствующего градиентно разведенного антитела и инкубировали на льду на протяжении 30 минут; затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл PD-L1-mFc, полученную смесь тщательно перемешивали, достигая конечной концентрации 20 нМ, и затем инкубировали на льду на протяжении 1 часа. Затем добавляли 500 мкл 1%-го PBSA и полученную смесь центрифугировали при 5600 об/мин на протяжении 5 минут для удаления супернатанта. Затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл козьего противомышиного антитела с FITC, разведенного в отношении 1:500, и после тщательного перемешивания полученную смесь инкубировали на льду на протяжении 40 минут в отсутствие света. Затем смесь центрифугировали, промывали и ресуспендировали, после чего переносили ее в пробирку для анализа.

Результаты показаны на ФИГ. 19, и значения MFI при каждой концентрации показаны в Таблице 12. По результатам количественного анализа флуоресценции и подбора кривых было рассчитано, что значения EC_{50} связывания антител VP101 и 14C12H1L1 составляли 8,33 нМ и 4,37 нМ, соответственно.

Таблица 12: Анализ интенсивности флуоресценции при конкурировании 14C12H1L1 и VP101 за связывание с поверхностным антигеном 293T-PD-1, определенной посредством FACS

Антитело (нМ)	0,05	0,14	0,41	1,23	3,70	11,11	33,33	100,00	EC ₅₀	R ²
14C12H1L1	288,17	287,29	277,09	237,22	177,80	12,04	10,32	9,87	4,37	0,988
VP101	272,66	264,39	279,11	272,26	239,18	99,29	17,05	14,91	8,33	0,999

Представленные результаты показывают, что антитело VP101 может эффективно блокировать связывание PD-L1 с PD-1 на поверхности клеток-хозяев 293T-PD-1 дозозависимым образом.

2. Значения EC₅₀ VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и ниволумаба при их конкуренции с PD-L1 за связывание с поверхностным антигеном клеточной мембраны PD-1 определяли с применением конкурентной проточной цитометрии, следуя экспериментальной методике, описанной на стадии 1 данного примера.

Результаты показаны на ФИГ. 20, и значения MFI при каждой концентрации показаны в Таблице 13. По результатам количественного анализа флуоресценции и подбора кривых было рассчитано, что значения EC₅₀ конкурентного связывания антител VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и ниволумаба составляли 15,04 нМ, 22,25 нМ, 19,25 нМ, 9,21 нМ и 9,72 нМ, соответственно.

Таблица 13: Анализ интенсивности флуоресценции при конкурировании VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1 и ниволумаба за связывание с поверхностным антигеном 293T-PD-1, определенной посредством FACS

Антитело (нМ)	0,14	0,41	1,23	3,7	11,11	33,33	100	300	EC ₅₀	R ²
VP101	1441,94	1380,62	1368,15	1288,34	982,69	112,90	8,49	8,21	15,04	0,9971
BsAbB7	1412,62	1377,27	1339,60	1341,27	1094,35	417,70	9,23	9,18	22,25	0,9985
BsAbB8	1578,36	1521,50	1427,20	1429,85	1137,74	359,69	9,73	9,68	19,25	0,9962
14C12H1L1	1384,08	1551,05	1462,85	1296,64	580,45	12,93	13,37	14,99	9,21	0,9950
Ниволумаб	1539,58	1552,37	1483,84	1300,81	713,56	70,92	60,77	56,92	9,72	0,9969

Представленные результаты показывают, что активность антитела 14C12H1L1 эквивалентна активности имеющегося в продаже антитела ниволумаб, направленного на PD-1, и превосходит активность бифункционального антитела VP101. Активность антитела VP101 превосходит активность BsAbB7 и BsAbB8.

Пример 6: Определение нейтрализующей биологической активности антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 при блокировании активирующего действия VEGF на сигнальный путь NFAT

1. Конструирование клеток 293T-NFAT-(орv)KDR(C7)

Клетки 293T трансфицировали KDR(VEGFR2)-вектором pCDH-KDRFL(OPV)-GFP-Puro (вектор pCDH-GFP-Puro приобретали у Youbio) и NFAT-вектором pNFAT-luc-hygro (вектор pGL4-luc2P-hygro приобретали у Promega) и посредством скрининга получали клональную группу клеток 293T-NFAT-(орv)KDR(C7), стабильно экспрессирующих гены KDR и NFAT с люциферазным репортером.

2. Клетки 293T-NFAT-(орv)KDR(C7) собирали и центрифугировали на протяжении 5 минут для удаления супернатанта; для ресуспендирования клеток использовали среду DMEM+10%FBS и проводили подсчет клеток и определение их жизнеспособности; затем концентрацию клеток корректировали до необходимого диапазона и полученную клеточную суспензию, 50000 клеток/50 мкл, добавляли в каждую лунку черного 96-луночного планшета.

Проводили разведение соответствующих антител (конечные концентрации 300, 100, 10, 2, 0,2, 0,02, 0,002 нМ) и VEGF (конечная концентрация 30 мг/мл) согласно плану эксперимента и предварительно инкубировали антитела, направленные на VEGF, с VEGF на протяжении 1 часа при комнатной температуре перед их добавлением к клеткам. В план эксперимента были включены отрицательные и изотипические контроли (конечный объем каждой лунки 100 мкл), и их инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ на протяжении 4 часов; в каждую лунку вносили по 50 мкл системы для люциферазного анализа (Luciferase Assay System) и относительные единицы флуоресценции (Relative Fluorescence Units, RLU) определяли в течение 5 минут с использованием анализатора для микропланшетов, позволяющего выявлять множество меток.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 21, и значения EC₅₀ для каждого антитела показаны в Таблице 14.

Таблица 14: Определение нейтрализующей биологической активности антител VP101, BsAbB7 и BsAbB8 при блокировании активирующего действия VEGF на сигнальный путь NFAT посредством репортерного анализа

Образец	VP101	BsAbB7	BsAbB8	Бевацизумаб
EC ₅₀ (нМ)	1,2400	1,2170	1,7280	0,7730

Согласно представленным результатам, EC₅₀ VP101 составляет 1,240 нМ, EC₅₀ BsAbB7 составляет 1,217 нМ, EC₅₀ BsAbB8 составляет 1,728 нМ, а EC₅₀ бевацизумаба составляет 0,773 нМ, и полученные экспериментальные результаты показывают, что у VP101 и BsAbB7 активность при блокировании активирующего действия VEGF на сигнальный путь NFAT лучше, чем у BsAbB8.

Пример 7: Эксперимент с ингибированием пролиферации клеток HUVEC, индуцированной VEGFA, антителом VP101

Клетки HUVEC (приобретенные у Allcell) в хорошем состоянии роста, после корректировки концентрации клеток до $1,5 \times 10^4$ /мл, засевали в 96-луночный планшет по 200 мкл на лунку и затем инкубировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ на протяжении 24 часов. После этого наблюдали хорошее прикрепление клеток и культуральную среду удаляли. Затем в 96-луночный планшет добавляли 20 нМ VEGFA, приготовленный с использованием 1640, содержащей 2% FBS, по 200 мкл на лунку, и добавляли антитела в различных концентрациях с последующим инкубированием на протяжении 72 часов. Через 72 часа культуральную среду удаляли и добавляли МТТ. Через 4 часа МТТ удаляли, добавляли DMSO и затем измеряли значение OD при 450 нм с использованием устройства для прочтения микропланшетов.

Результаты показаны на ФИГ. 22. Полученные результаты показывают, что гуманизированные антитела VP101 и бевацизумаб могут эффективно ингибировать пролиферацию клеток HUVEC, индуцированную VEGFA, дозозависимым образом и что у VP101 фармакологическая активность по ингибированию пролиферации клеток HUVEC, индуцированной VEGFA, выше, чем у бевацизумаба при той же дозе.

Пример 8: Стимулирование секреции цитокинов IFN- γ и IL-2 при смешанной лимфоцитарной реакции

1. Стимулирование секреции IFN- γ под действием VP101, 14C12H1L1 и ниволумаба в системе смешанной клеточной культуры DC и PBMC

PBMC выделяли с использованием Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) и добавляли к IL-4 (PeproTech, 200-04, 1000 ЕД/мл) и GM-CSF (PeproTech, 300-03, 1000 ЕД/мл) для индуцирования продолжительностью 6 суток и затем дополнительно добавляли TNF- α (PeproTech, 300-01A, 200 ЕД/мл) для индуцирования продолжительностью 3 суток с получением зрелых DC.

На сутки совместного культивирования из периферической крови другого донора выделяли свежие PBMC, полученные зрелые DC смешивали со свежевыделенными PBMC другого донора в отношении 1:10 и попутно добавляли антитела в различных концентрациях (hIgG в качестве контроля). После совместного культивирования продолжительностью 5-6 суток клеточный супернатант собирали и анализировали на предмет содержания IFN- γ с использованием набора для ELISA (приобретенного у Dakewe).

Эффект VP101 на секрецию IFN- γ в системе смешанной культуры DC и PBMC показан на ФИГ. 23. Как видно на ФИГ. 23, VP101 может эффективно стимулировать секрецию IFN- γ дозозависимым образом. Кроме того, в дозах 30 нМ и 300 нМ VP101 обладает большей активностью по стимулированию секреции IFN- γ , чем эквивалентные дозы 14C12H1L1, и в дозе 30 нМ оно обладает большей активностью по стимулированию секреции IFN- γ , чем эквивалентная доза ниволумаба.

2. Стимулирование секреции IL-2 и IFN- γ под действием VP101, BsAbB7 и BsAbB8b в системе смешанной клеточной культуры DC и PBMC

Примененная экспериментальная методика соответствовала описанной на стадии 1 данного примера, а именно PBMC выделяли с использованием Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) и добавляли к IL-4 (PeproTech, 200-04, 1000 ЕД/мл) и GM-CSF (PeproTech, 300-03, 1000 ЕД/мл) для индуцирования продолжительностью 6 суток и затем дополнительно добавляли TNF- α (PeproTech, 300-01A, 200 ЕД/мл) для индуцирования продолжительностью 3 суток с получением зрелых DC.

На сутки совместного культивирования из периферической крови другого донора выделяли свежие PBMC, полученные зрелые DC смешивали со

свежевыделенными PBMC другого донора в отношении 1:10 и попутно добавляли антитела в различных концентрациях (hIgG в качестве контроля); после совместного культивирования продолжительностью 5-6 суток клеточный супернатант собирали и анализировали на предмет содержания IL-2 и IFN- γ с использованием набора для ELISA (приобретенного у Dakewe).

Эффект VP101 на секрецию IFN- γ в системе смешанной культуры DC и PBMC показан на ФИГ. 24. Как видно из ФИГ. 24, VP101 может эффективно стимулировать секрецию IFN- γ дозозависимым образом. Фармакологическая активность VP101 по стимулированию секреции IFN- γ значительно лучше, чем у BsAbB7 и BsAbB8.

Эффект VP101 на секрецию IL-2 в системе смешанной культуры DC и PBMC показан на ФИГ. 25. Как видно из ФИГ. 25, VP101 может эффективно стимулировать секрецию IL-2 дозозависимым образом, и фармакологическая активность VP101 по стимулированию секреции IL-2 значительно лучше, чем у BsAbB7 и BsAbB8.

3. Стимулирование секреции IL-2 и IFN- γ под действием VP101, 14C12H1L1 и ниволумаба в системе смешанной культуры PBMC и клеток Raji-PD-L1

Клетки Raji стабильно трансфицировали PD-L1 посредством лентивирусной инфекции и после дозирования и скрининга получали клетки Raji-PD-L1, стабильно экспрессирующие PD-L1; PBMC, после двух суток стимулирования с использованием SEB, культивировали вместе с Raji-PD-L1, обработанными митомицином C.

Полученные результаты показаны на ФИГ. 26 и 27. Представленные результаты показывают, что VP101 может эффективно стимулировать секрецию IL-2 и IFN- γ и что в дозе 300 нМ VP101 обладает значительно лучшей активностью по стимулированию секреции IL-2, чем эквивалентная доза 14C12H1L1 и ниволумаба.

В качестве антитела изотипического контроля в данном анализе использовали человеческое антитело против лизоцима куриного яйца (против HEL, то есть человеческий IgG, сокращенно hIgG), и оно было получено, как описано в Примере получения 6 выше.

4. Стимулирование секреции IL-2 и IFN- γ под действием VP101, BsAbB7 и BsAbB8 в системе смешанной культуры PBMC и клеток Raji-PD-L1 изучали, применяя экспериментальную методику, описанную на стадии 3 данного примера.

Результаты по секреции IFN- γ показаны на ФИГ. 28. Представленные результаты показывают, что VP101 может эффективно стимулировать секрецию IFN- γ

дозозависимым образом. При этом VP101 значительно лучше, чем BsAbB7 в той же дозе, в то время как в дозах 3 нМ и 30 нМ фармакологическая активность VP101 значительно лучше, чем у BsAbB8.

Результаты по секреции IL-2 показаны на ФИГ. 29. Представленные результаты показывают, что VP101 может эффективно стимулировать секрецию IL-2 дозозависимым образом. При этом в дозах 3 нМ и 300 нМ фармакологическая активность VP101 значительно лучше, чем у BsAbB7, в то время как VP101 эквивалентно BsAbB8 в той же дозе.

Пример 9: Эксперимент с ингибированием опухолевого роста *in vivo* под действием VP101

Для определения активности VP101 по ингибированию опухоли *in vivo* клетки U87MG (клетки глиомы человека, приобретенные у ATCC) сначала вводили подкожно самкам мышей Scid Beige в возрасте 5-7 недель (приобретенным у Vital River), и модель и конкретный способ введения показаны в Таблице 15. После введения в каждой группе измеряли длину и ширину опухолей и рассчитывали их объем.

Таблица 15: Схема введения VP101 при ксенотрансплантации опухоли U87MG у мышей Scid Beige

Группы	n	Ксенотрансплантируемая опухоль	Условия введения
Изотипический контроль 40 мг/кг	7	U-87MG, 5 миллионов клеток на мышь, подкожно	Антитело изотипического контроля, hIgG, 40 мг/кг, внутривенные инъекции в 0, 7 и 13 сутки
Бевацизумаб 30 мг/кг	8		Бевацизумаб, 30 мг/кг, внутривенные инъекции в 0, 7 и 13 сутки
VP101 40 мг/кг	7		VP101, 40 мг/кг, внутривенные инъекции в 0, 7 и 13 сутки
VP101 4 мг/кг	7		VP101, 4 мг/кг, внутривенные инъекции в 0, 7 и 13 сутки

Результаты показаны на ФИГ. 30. Представленные результаты показывают, что, по сравнению с антителом изотипического контроля hIgG (способ получения которого идентичен описанному в Примере получения 6), бевацизумаб и VP101 в различных

дозах могут эффективно ингибировать рост опухолей у мышей и что в высокой дозе VP101 ингибирует опухоли лучше, чем в низкой дозе.

Кроме того, как показано на ФИГ. 31, VP101 не влияет на массу тела мышей с опухолями.

Несмотря на то, что содержание настоящего изобретения обеспечило полное и ясное описание его раскрытых воплощений, оно не ограничено ими. Руководствуясь этими описаниями, специалисты в данной области могут внести изменения и замены в настоящее изобретение, и объем настоящего изобретения включает такие изменения и замены. Полный объем настоящего изобретения определен приложенной формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее:

первую белковую функциональную область, направленную на VEGFA (фактор роста эндотелия сосудов A); и

вторую белковую функциональную область, направленную на PD-1 (белок программируемой клеточной смерти 1);

где:

первая белковая функциональная область представляет собой антитело против VEGFA или его антигенсвязывающий фрагмент, где переменная область тяжелой цепи антитела против VEGFA содержит HCDR1 (определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1) - HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи антитела против VEGFA содержит LCDR1 (определяющий комплементарность участок легкой цепи 1) - LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно; и

вторая белковая функциональная область представляет собой антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где переменная область тяжелой цепи антитела против PD-1 содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи антитела против PD-1 содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно.

2. Биспецифическое антитело по п. 1, где:

антитело против VEGFA или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента участка, определяющего комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела;

и/или

антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента участка, определяющего комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

3. Биспецифическое антитело по п. 1, где:

первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи этого иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи этого иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи этого одноцепочечного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи этого одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно;

или

первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи этого одноцепочечного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:21-23, соответственно, и переменная область легкой цепи этого одноцепочечного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:24-26, соответственно; и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин, где переменная область тяжелой цепи этого иммуноглобулина содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:15-17, соответственно, и переменная область легкой цепи этого иммуноглобулина содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:18-20, соответственно.

4. Биспецифическое антитело по п. 3, где:

аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная

последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11;

или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела изложена в SEQ ID NO:11; и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7.

5. Биспецифическое антитело по п. 3 или п. 4, где иммуноглобулин представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM; предпочтительно, иммуноглобулин представляет собой IgG.

6. Биспецифическое антитело по п. 3 или п. 4, где присутствуют два одноцепочечных антитела и один конец каждого одноцепочечного антитела связан с С-концом или N-концом одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина.

7. Биспецифическое антитело по п. 3 или п. 4, где:

иммуноглобулин содержит область, не являющуюся CDR, имеющую происхождение из вида, отличного от мыши, например из человеческого антитела.

8. Биспецифическое антитело по п. 3 или п. 4, где:

иммуноглобулин содержит константные области, имеющие происхождение из человеческого антитела;

предпочтительно, константные области иммуноглобулина выбраны из константных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

9. Биспецифическое антитело по п. 3 или п. 4, где:

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-1 человеческого Ig или С-область цепи гамма-4 человеческого Ig и его константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа человеческого Ig.

10. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2, где первая и вторая белковые функциональные области связаны непосредственно или через линкерный фрагмент;

предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой $(GGGS)_m$, где m представляет собой положительное целое число, такое как 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

11. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2, где каждое из числа первых белковых функциональных областей и числа вторых белковых функциональных областей независимо представляет собой 1, 2 или более.

12. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2, где:

биспецифическое антитело связывается с белком VEGFA с EC_{50} менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,15 нМ или менее 0,14 нМ; предпочтительно, EC_{50} определена непрямым ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ);

и/или

биспецифическое антитело связывается с белком PD-1 с EC_{50} менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,17 нМ, менее 0,16 нМ или менее 0,15 нМ; предпочтительно, EC_{50} определена непрямым ELISA.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12.

14. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13.

15. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13 или вектор по п. 14.

16. Способ получения биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12, включающий: культивирование клетки-хозяина по п. 15 в подходящих условиях и выделение биспецифического антитела из клеточных культур.

17. Конъюгат, содержащий биспецифическое антитело и конъюгированную группировку, где биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12 и конъюгированная группировка представляет собой выявляемую метку; предпочтительно, конъюгированная группировка представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

18. Набор, содержащий биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12 или конъюгат по п. 17,

где, предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, способное специфично связываться с биспецифическим антителом; возможно, второе антитело дополнительно содержит выявляемую метку, такую как радиоизотоп,

флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

19. Применение биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12 в изготовлении набора для определения присутствия или уровня VEGFA и/или PD-1 в образце.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12 или конъюгат по п. 17 и возможно фармацевтически приемлемый эксципиент.

21. Применение биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12 или конъюгата по п. 17 в изготовлении лекарственного средства для предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

22. Применение биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12 или конъюгата по п. 17 в изготовлении:

(1)

лекарственного средства или агента для определения уровня VEGFA в образце,
лекарственного средства или агента для блокирования связывания VEGFA с VEGFR2 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2),

лекарственного средства или агента для понижающего регулирования активности или уровня VEGFA,

лекарственного средства или агента для уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

лекарственного средства или агента для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

лекарственного средства или агента для блокирования опухолевого ангиогенеза;
и/или

(2)

лекарственного средства или агента для блокирования связывания PD-1 с PD-L1 (лиганд PD-1),

лекарственного средства или агента для понижающего регулирования активности или уровня PD-1,

лекарственного средства или агента для уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

лекарственного средства или агента для стимуляции секреции IFN- γ (интерферон γ) Т-лимфоцитами или

лекарственного средства или агента для стимуляции секреции IL-2 (интерлейкин 2) Т-лимфоцитами.

23. *In vivo* или *in vitro* способ, включающий введение в клетку эффективного количества биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12 или конъюгата по п. 17, выбранный из:

(1)

способа определения уровня VEGFA в образце,

способа блокирования связывания VEGFA с VEGFR2,

способа понижающего регулирования активности или уровня VEGFA,

способа уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

способа ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

способа блокирования опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

способа блокирования связывания PD-1 с PD-L1,

способа понижающего регулирования активности или уровня PD-1,

способа уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

способа стимуляции секреции IFN- γ Т-лимфоцитами или

способа стимуляции секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

24. Способ предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по любому из п.п. 1-12 или конъюгата по п. 17, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной

железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

25. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12 или конъюгат по п. 17 для применения в предотвращении и/или лечении злокачественной опухоли, где, предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга и лейкоза.

26. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 1-12 или конъюгат по п. 17 для применения в:

(1)

определении уровня VEGFA в образце,
блокировании связывания VEGFA с VEGFR2,
понижающем регулировании активности или уровня VEGFA,
уменьшении стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию
эндотелиальных клеток сосудов,

ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

блокировании опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

блокировании связывания PD-1 с PD-L1,

понижающем регулировании активности или уровня PD-1,

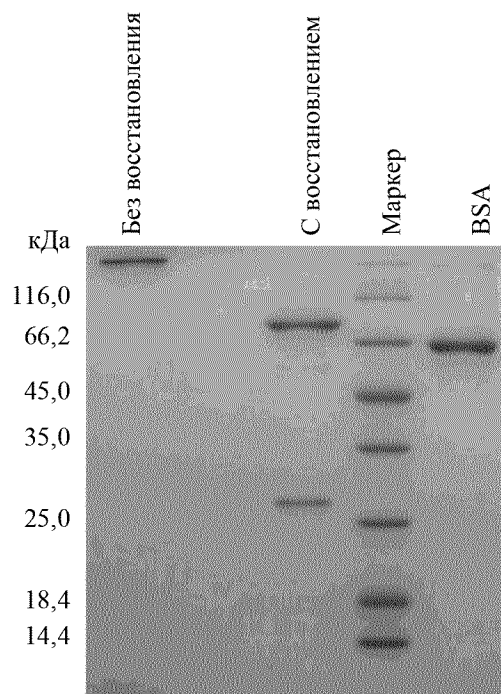
уменьшении иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

стимулировании секреции IFN- γ Т-лимфоцитами или

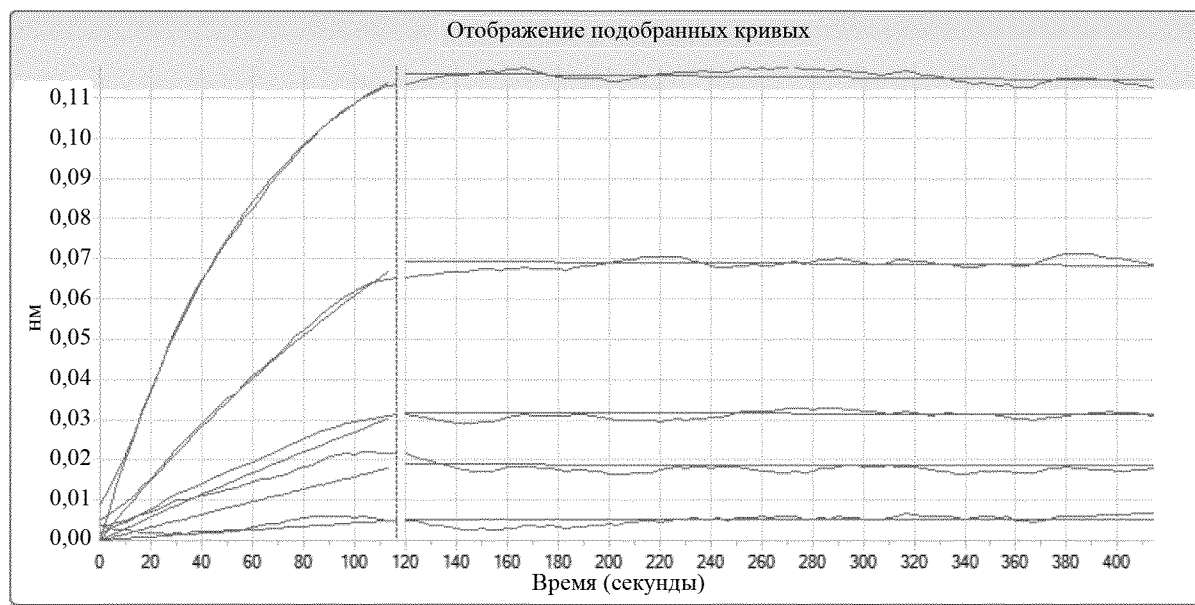
стимулировании секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

Бифункциональное антитело против PD-1 и против VEGFA,
его фармацевтическая композиция и его применение

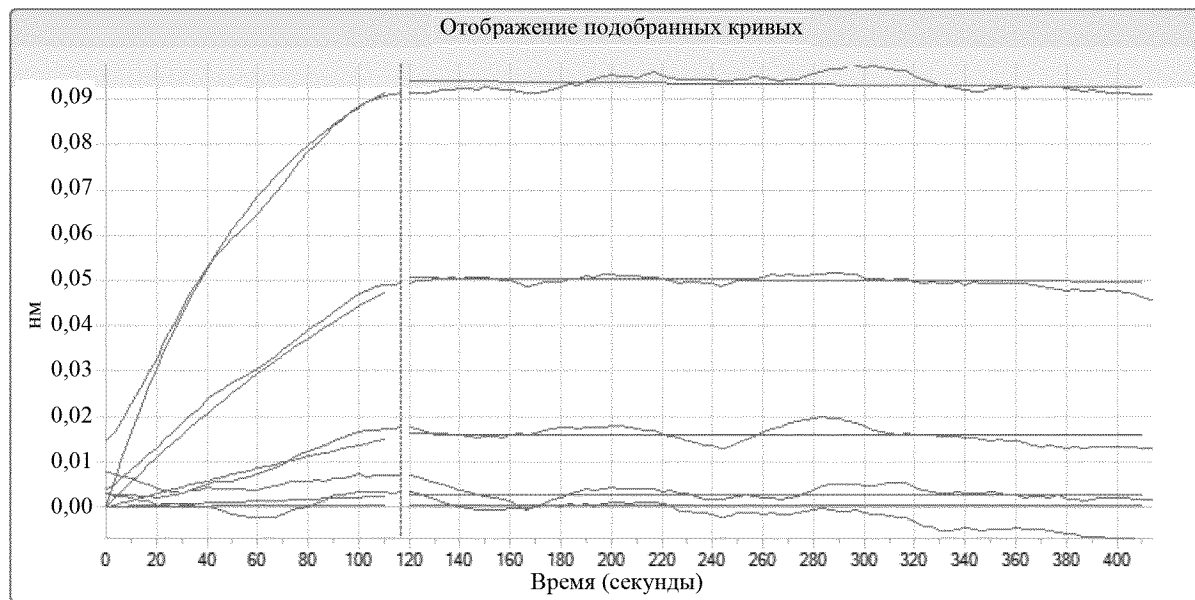
Фиг. 1



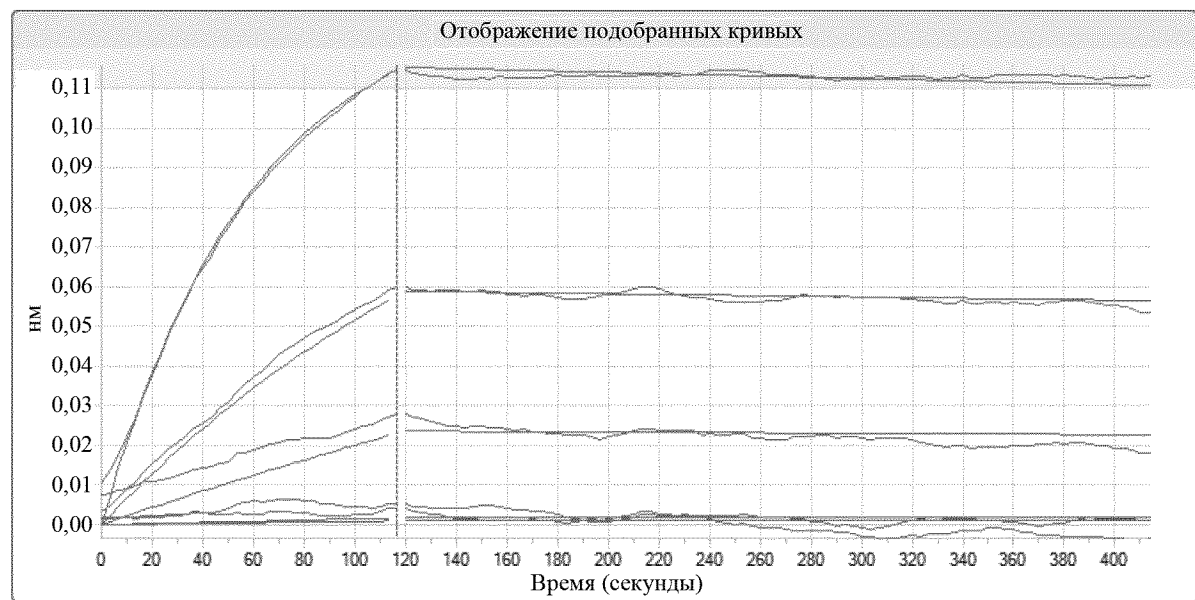
Фиг. 2

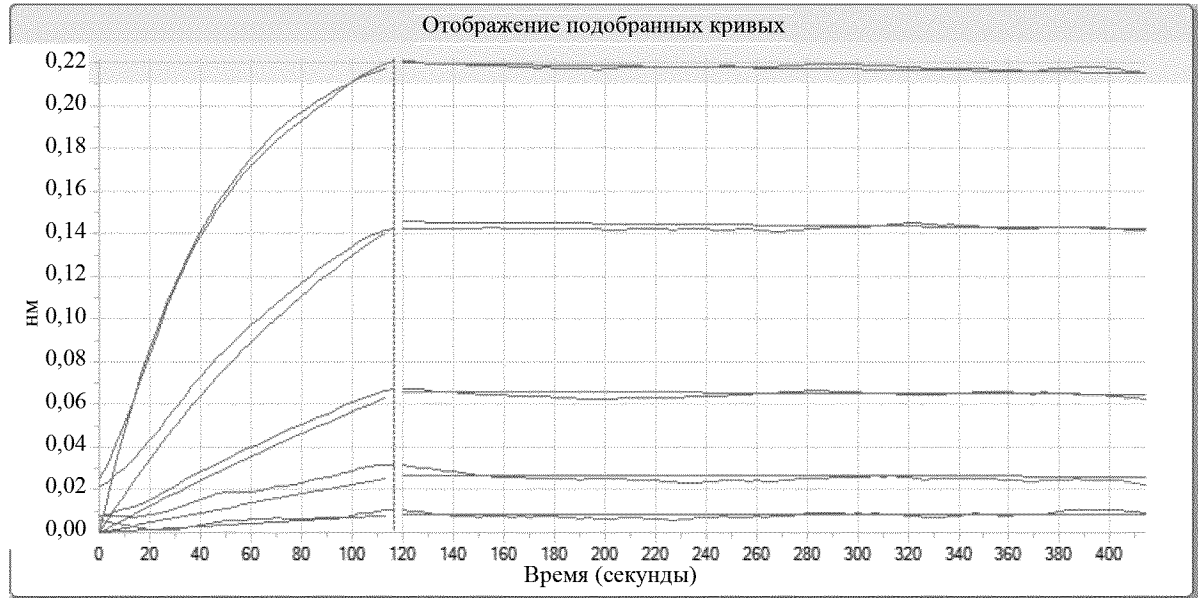
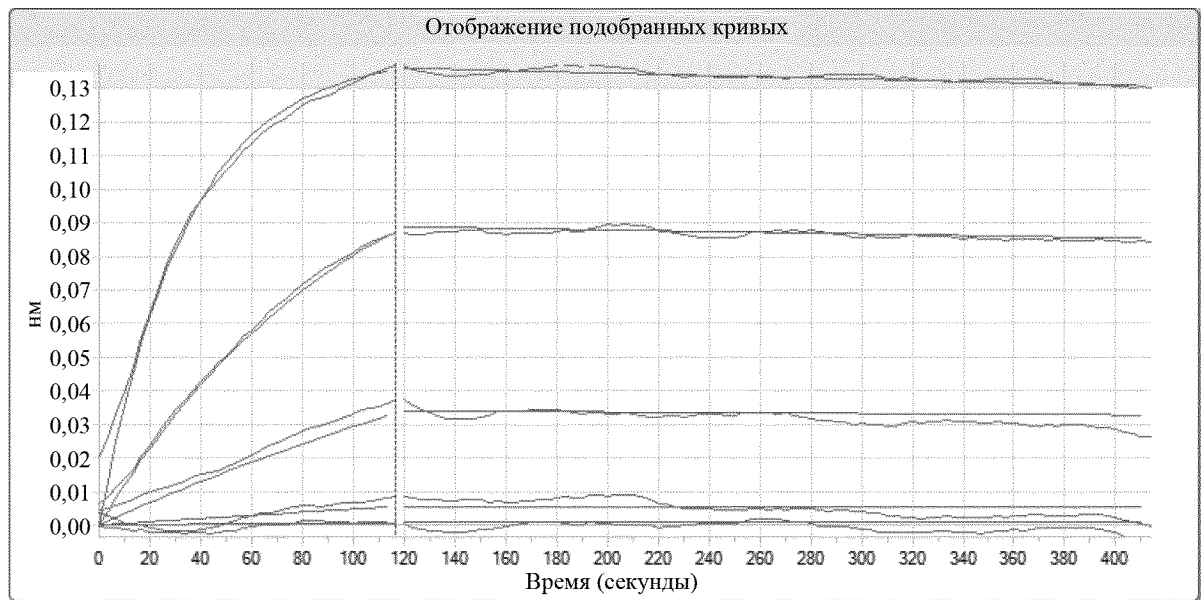


Фиг. 3

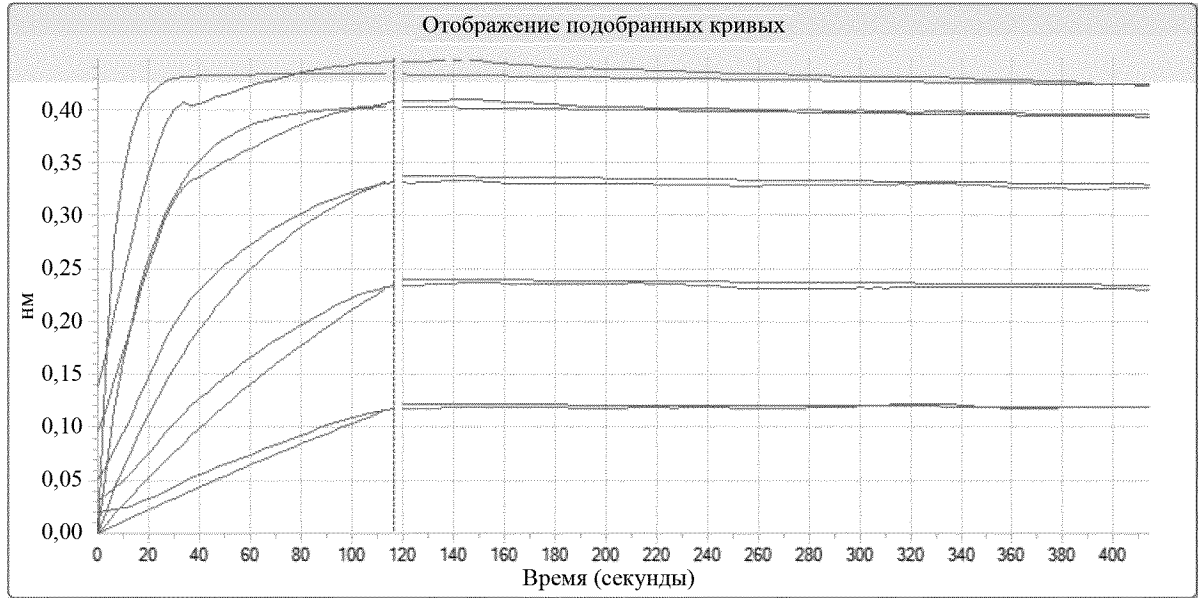


Фиг. 4

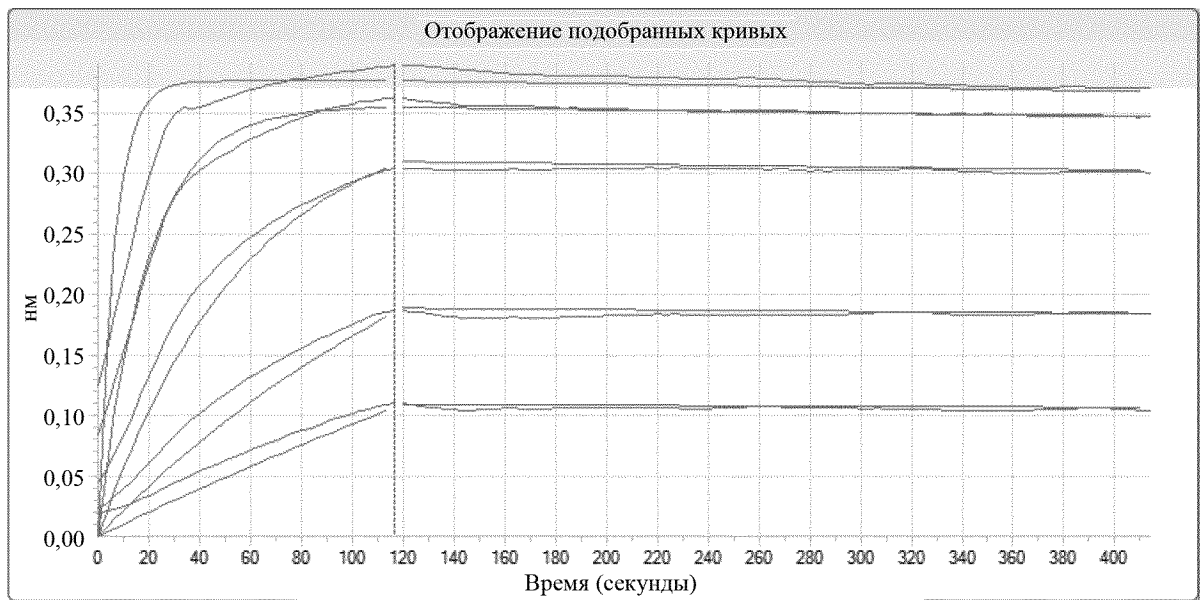


Фиг. 5**Фиг. 6**

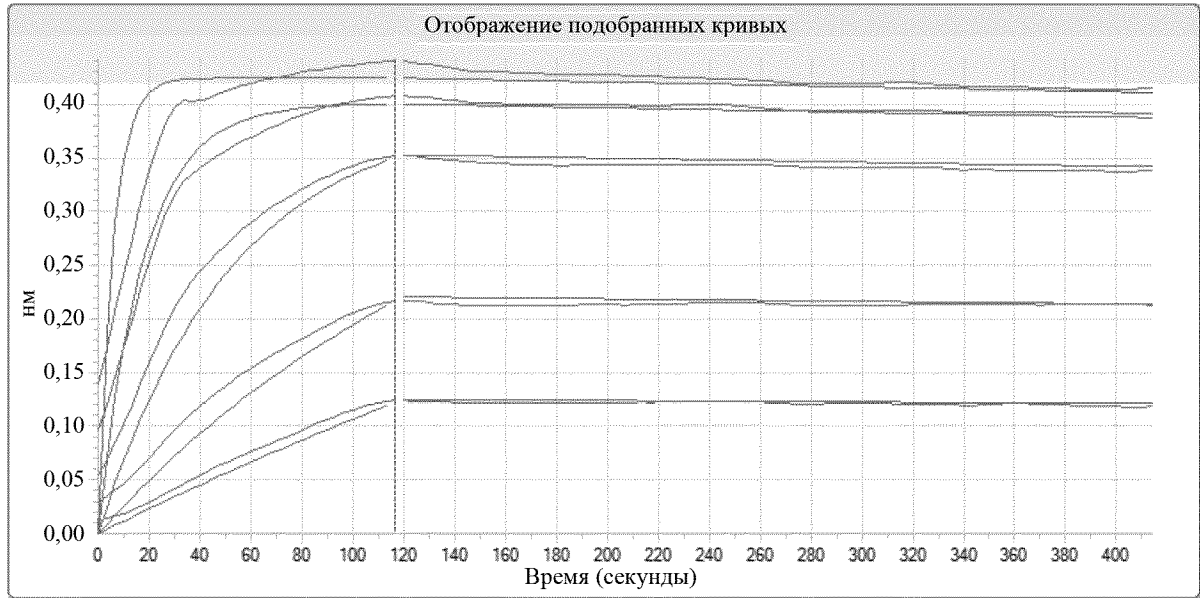
Фиг. 7



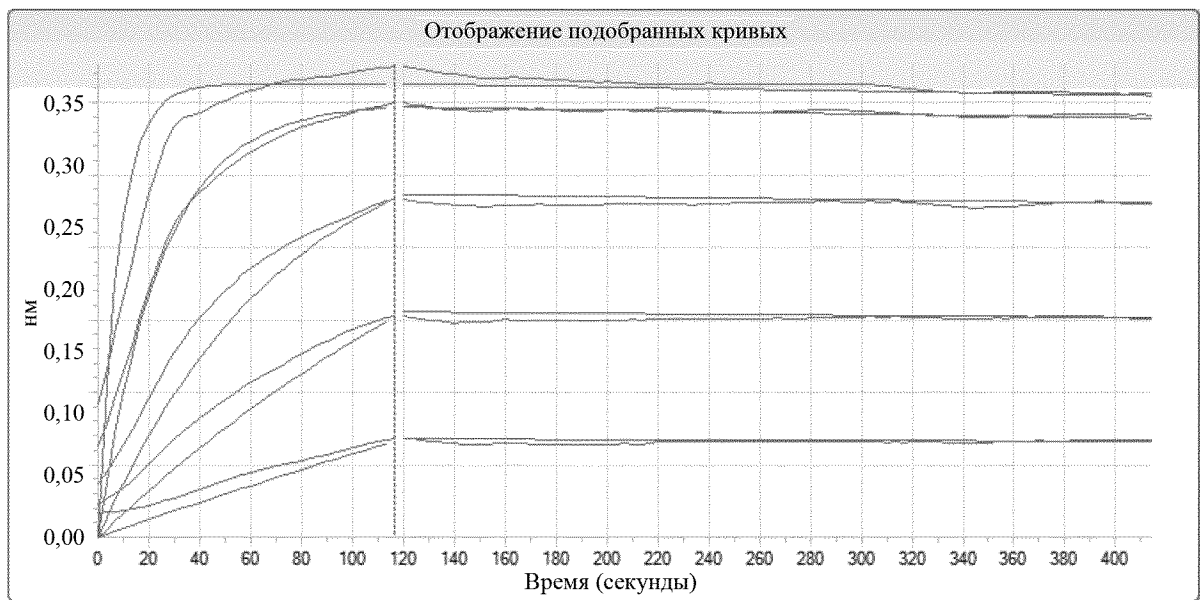
Фиг. 8



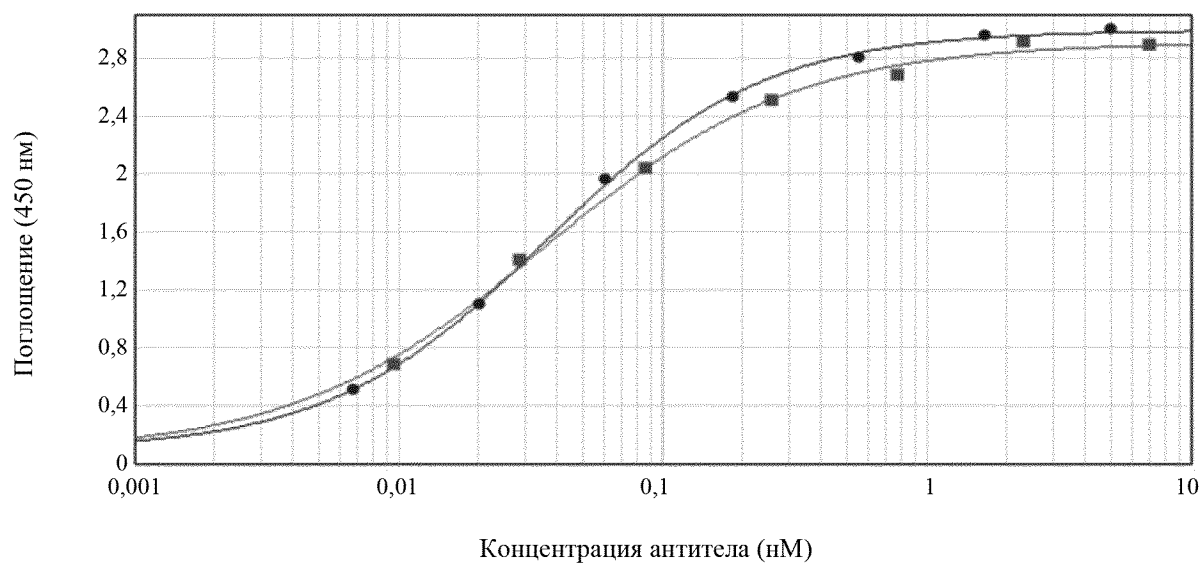
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



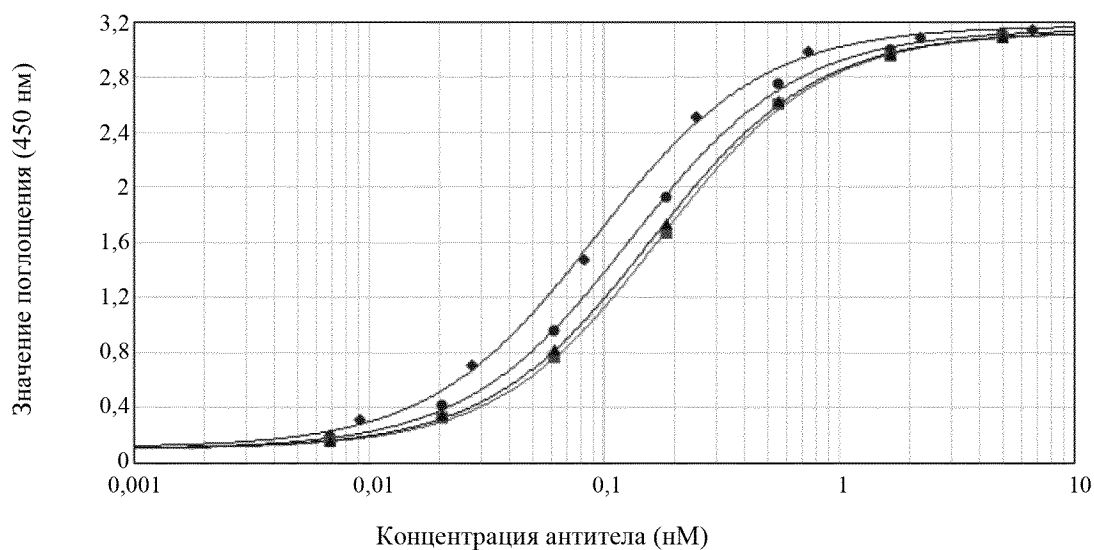
● VP101
■ Бевацизумаб

Результаты подбора кривой ▲

Подбор кривой:
4 параметра

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^B}$$

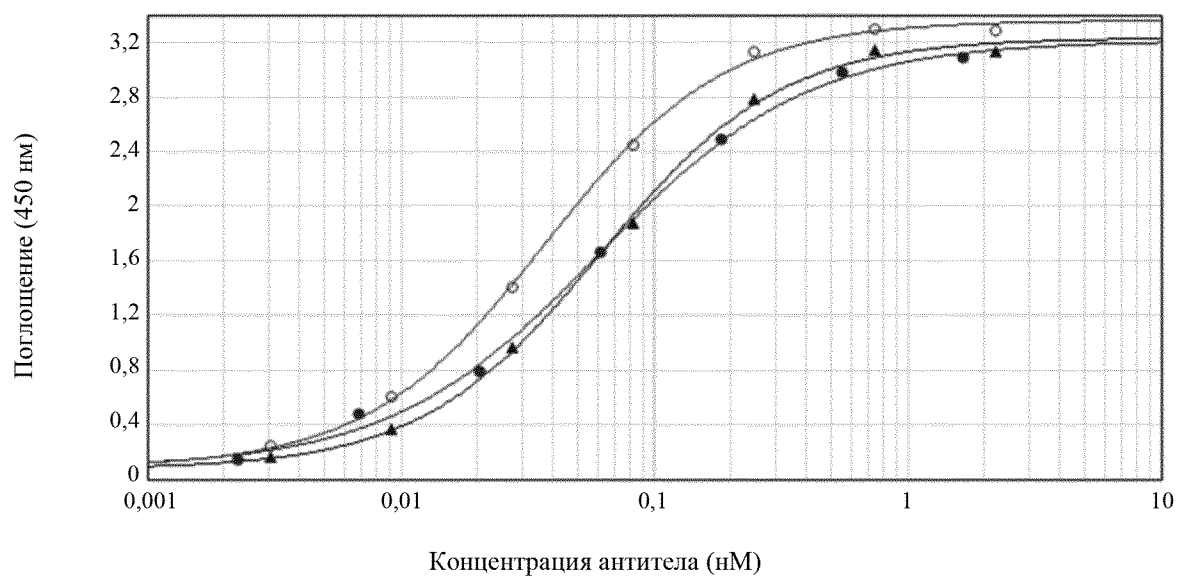
Фиг. 12



- VP101
- BsAbB7
- ▲ BsAbB8
- ◆ Бевацизумаб (Bevericizumab)

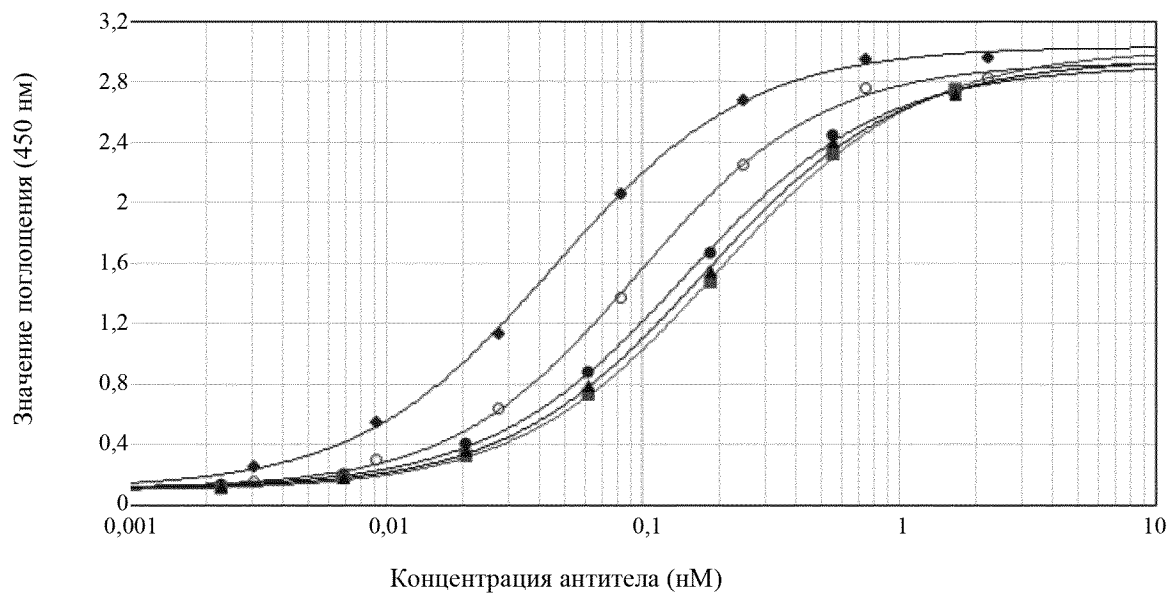
VP101	BsAbB7	BsAbB8	Bevericizumab
$R^2 = 1.000$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 0.999$
EC50 = 0.130	EC50 = 0.171	EC50 = 0.159	EC50 = 0.092

Фиг. 13



- VP101
- ▲ Ниволумаб
- 14C12H1L1

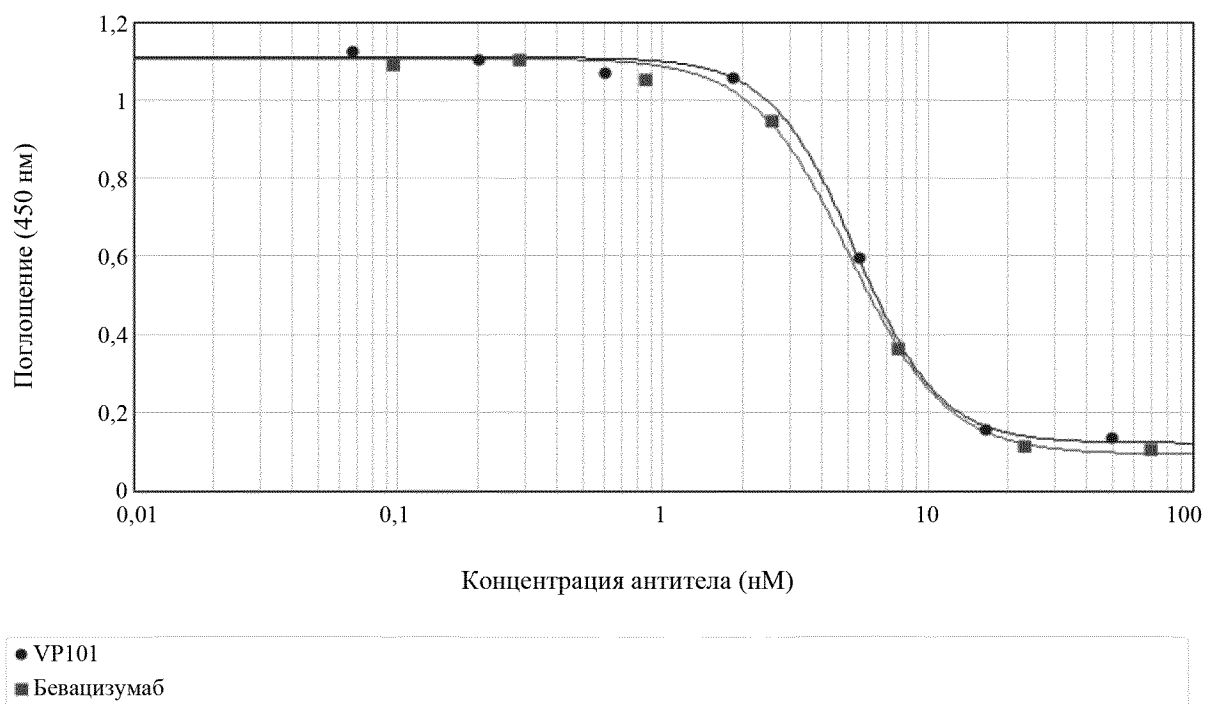
Фиг. 14



- VP101
- BsAbB7
- ▲ BsAbB8
- ◆ 14C12H1L1
- Ниволумаб (Nivolumab)

VP101	BsAbB7	BsAbB8	14C12 H1L1	Nivolumab
$R^2 = 0.999$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$
EC50 = 0.146	EC50 = 0.199	EC50 = 0.173	EC50 = 0.045	EC50 = 0.095

Фиг. 15

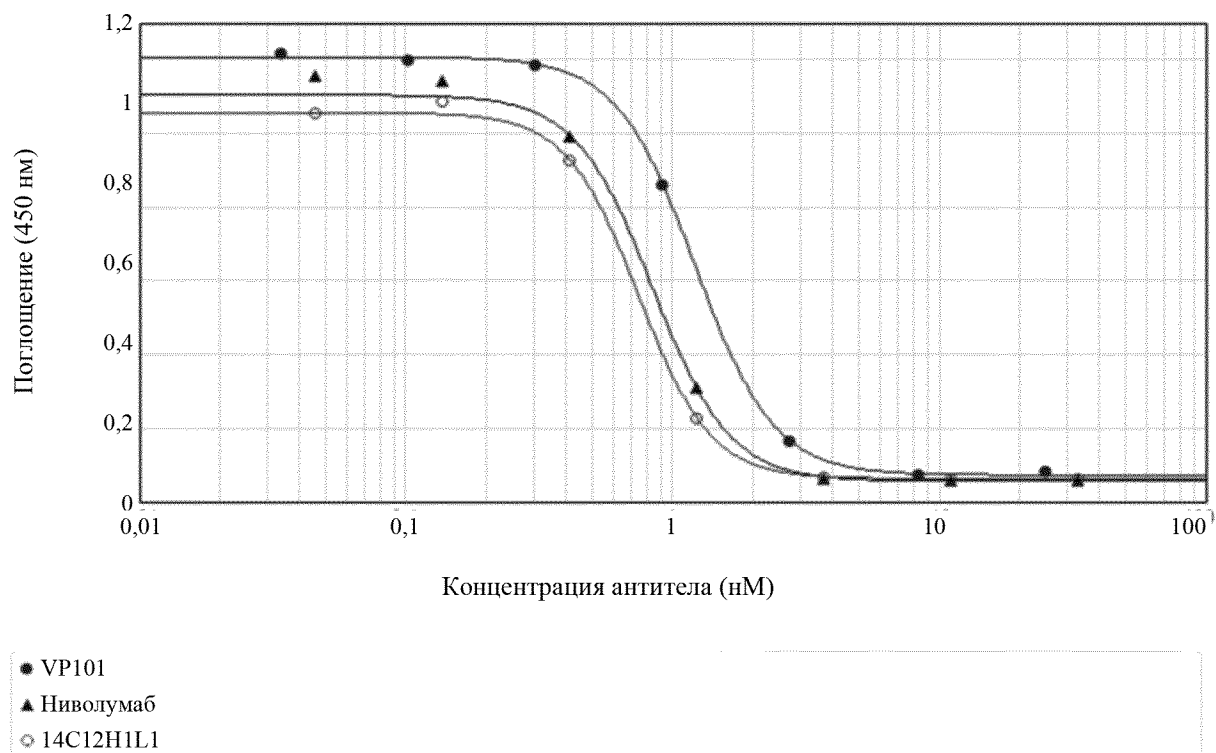


Результаты подбора кривой ▲

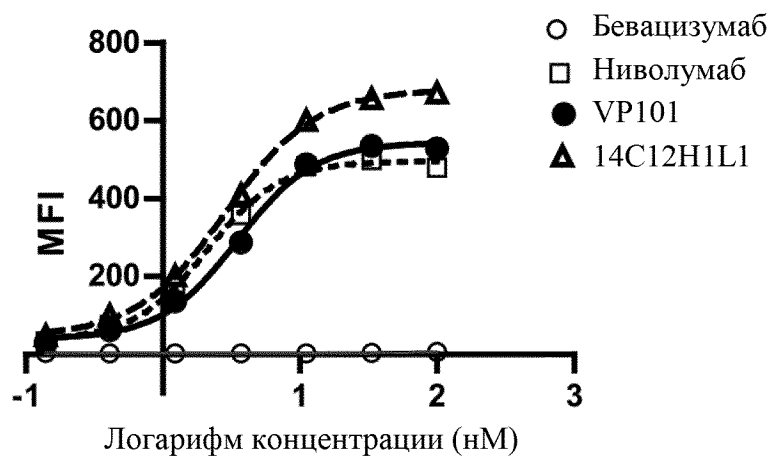
Подбор кривой:
4 параметра

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

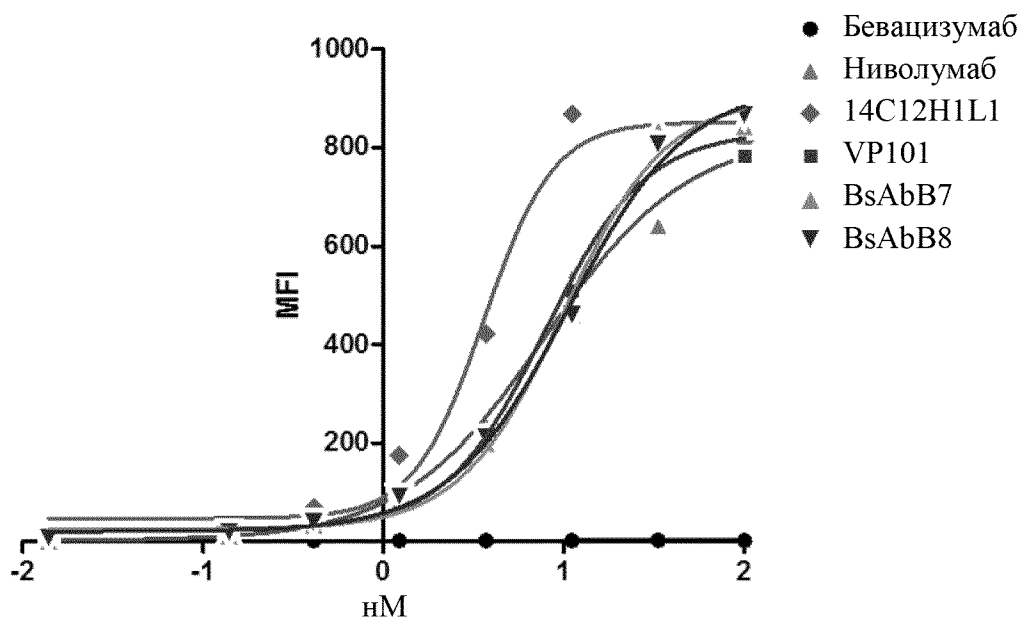
Фиг. 16



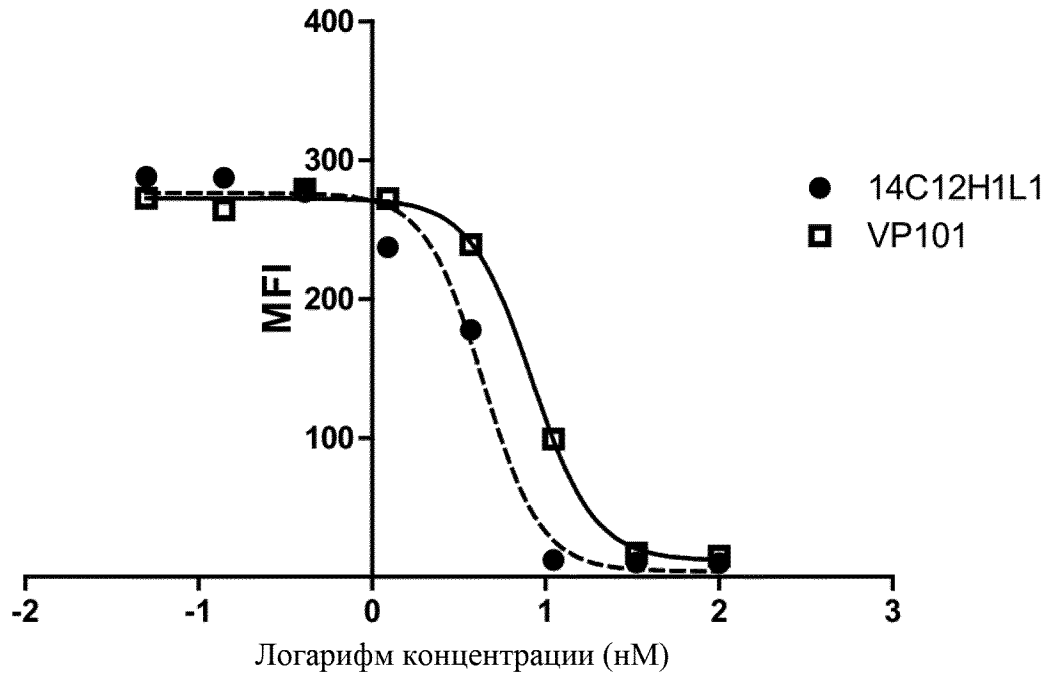
Фиг. 17



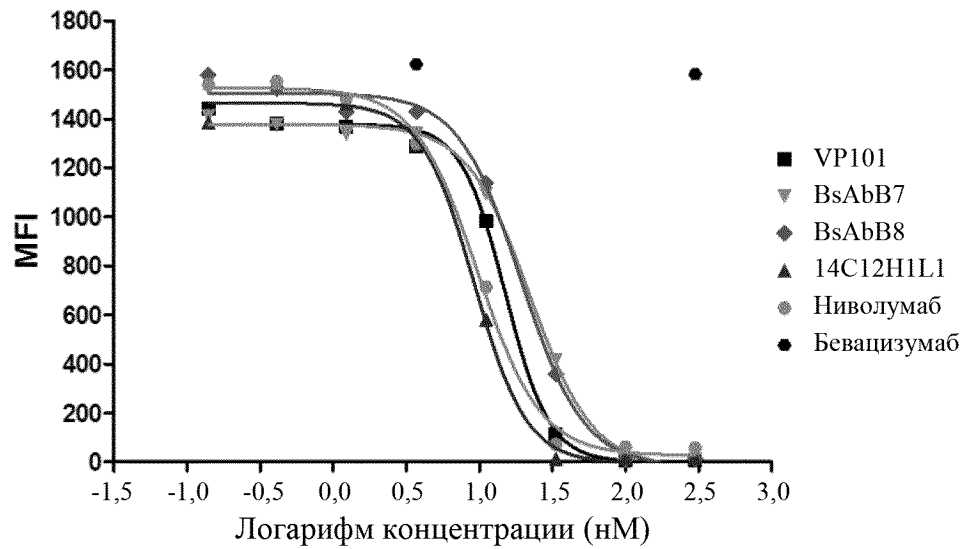
Фиг. 18



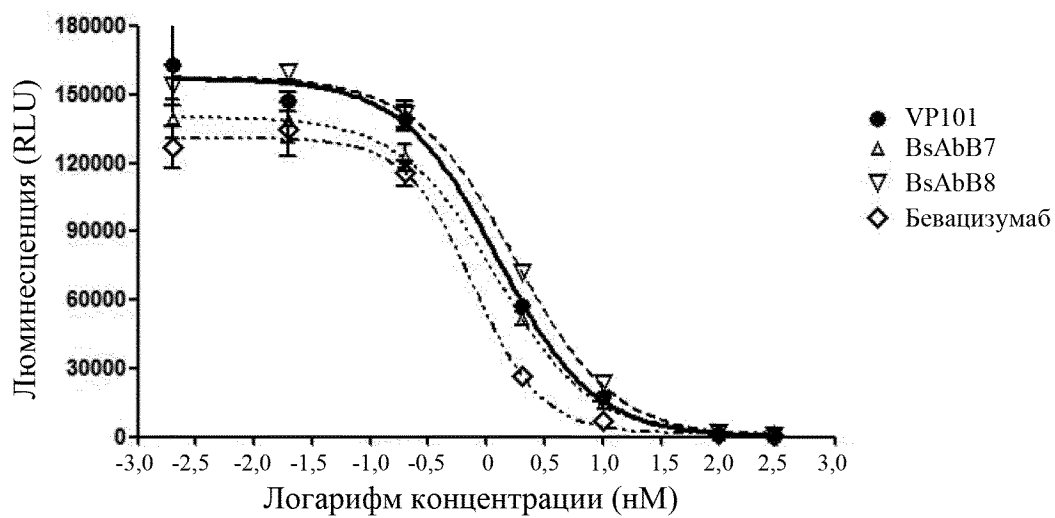
Фиг. 19



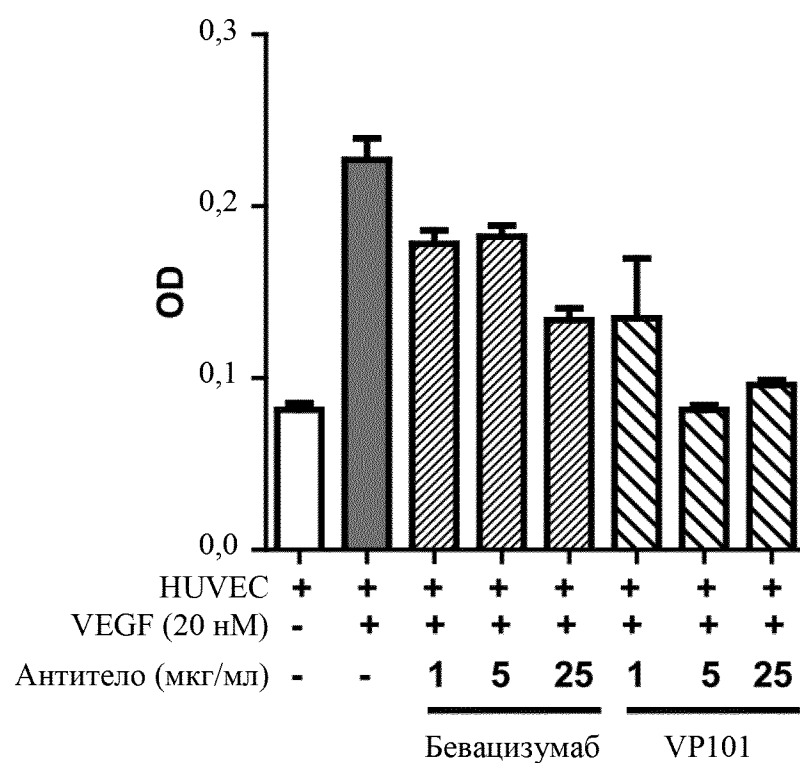
Фиг. 20



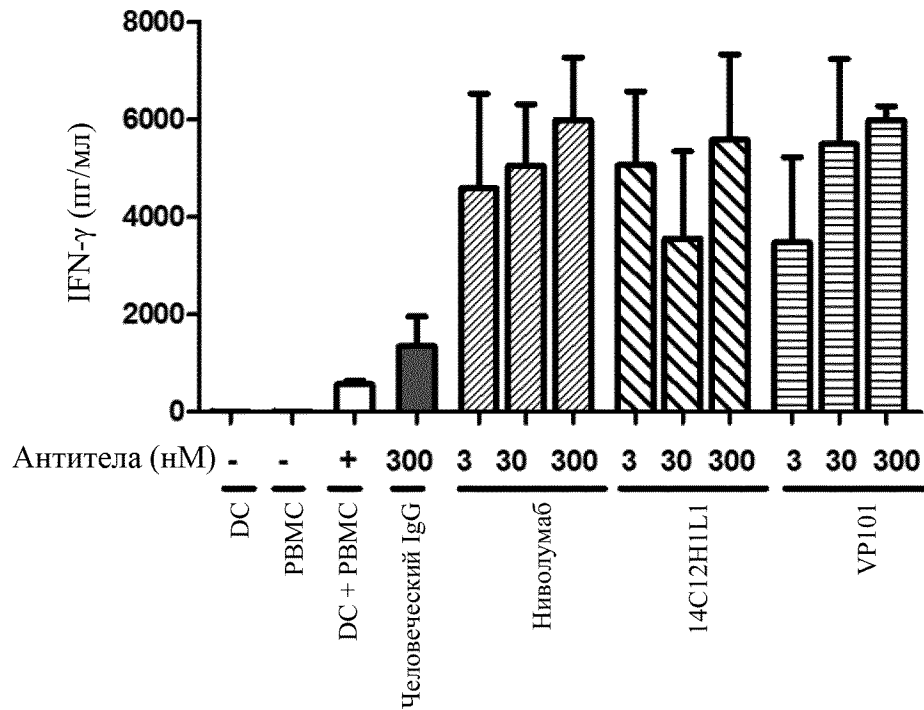
Фиг. 21



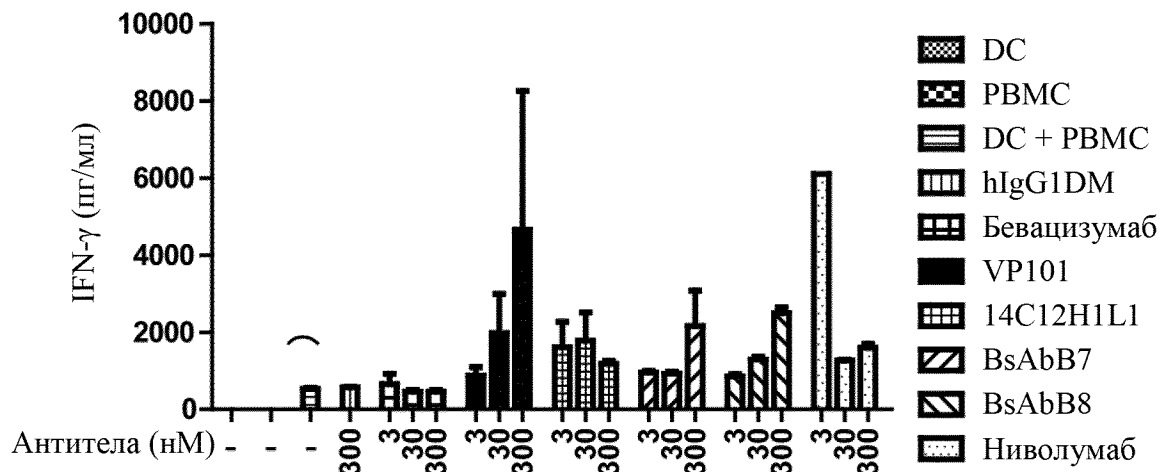
Фиг. 22



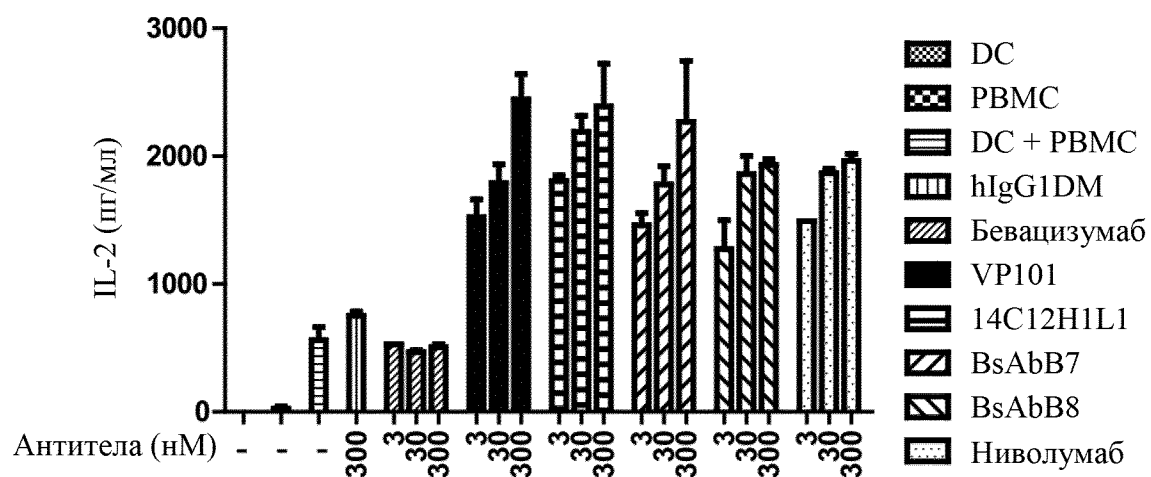
Фиг. 23



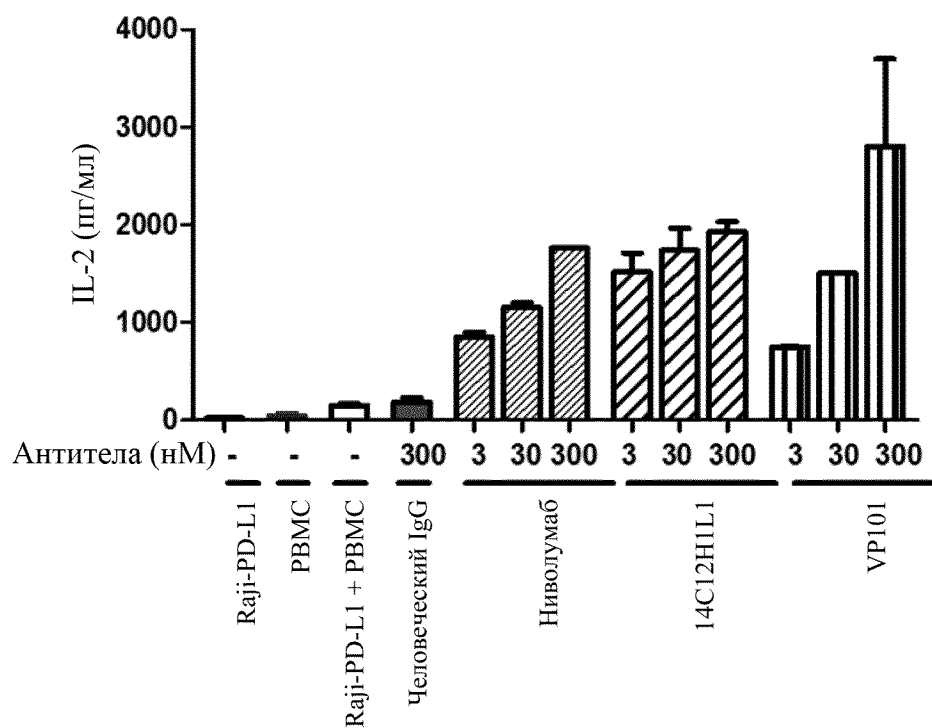
Фиг. 24



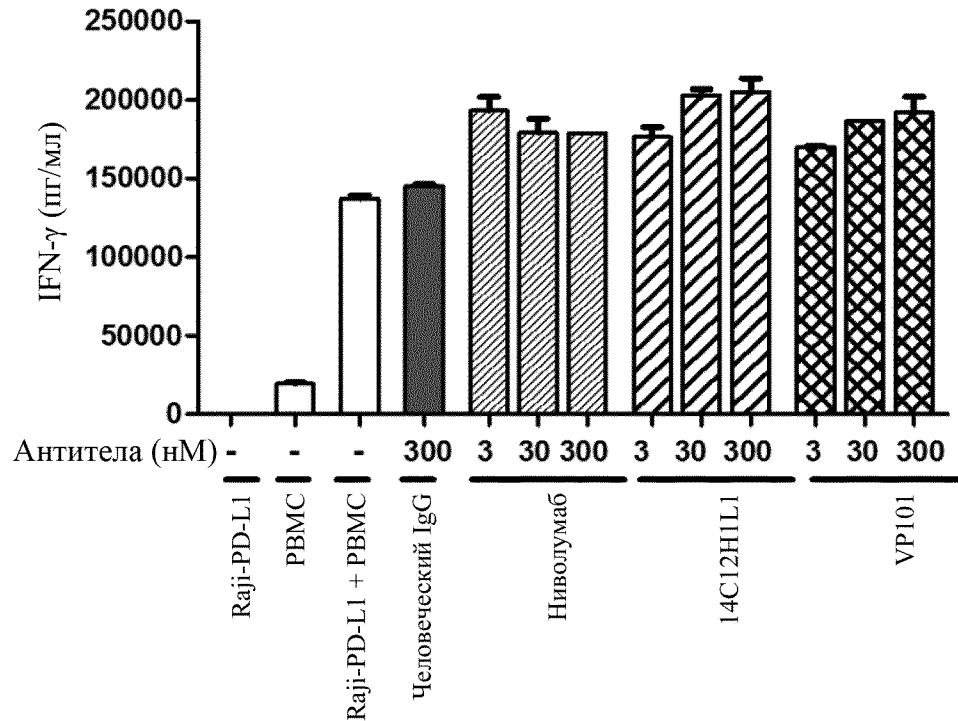
Фиг. 25



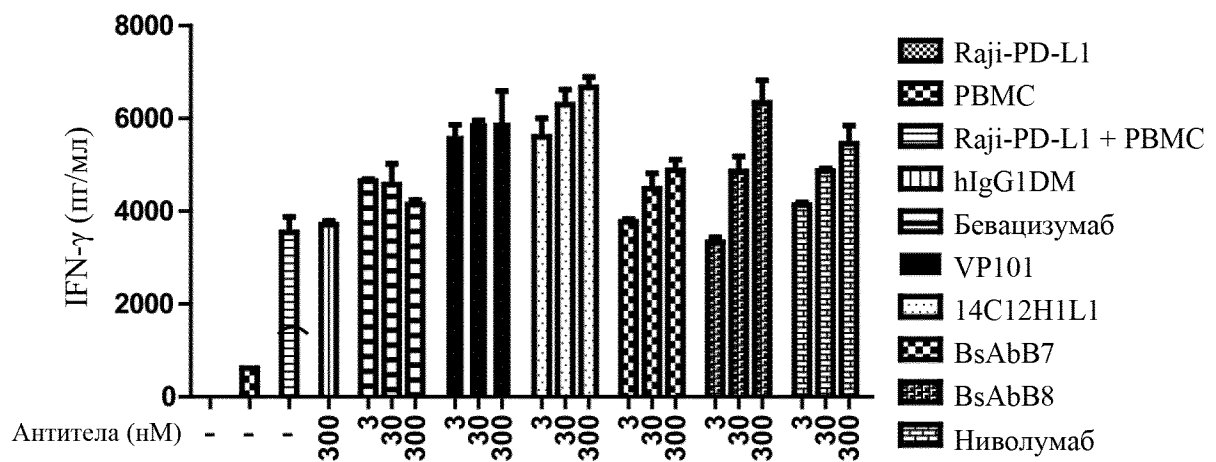
Фиг. 26



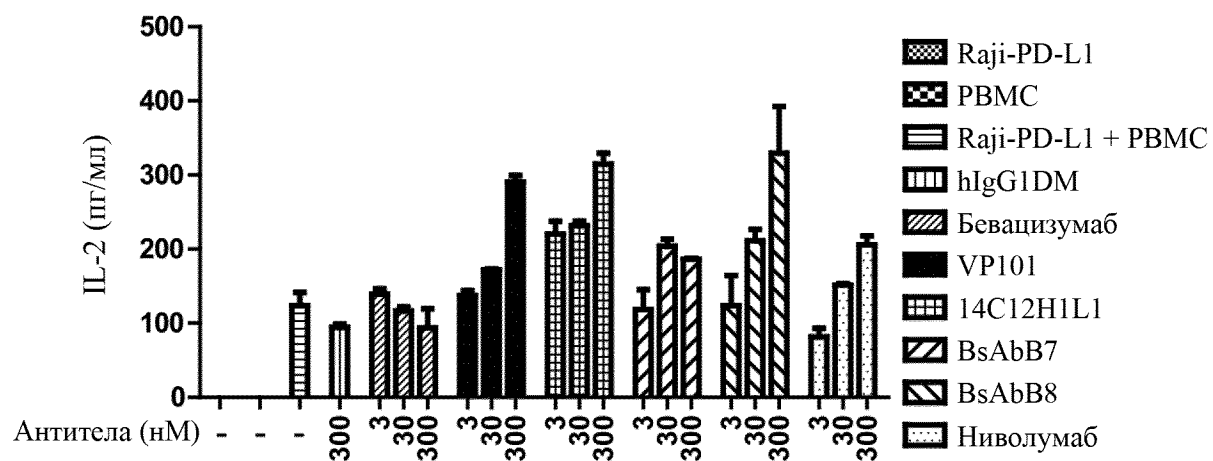
Фиг. 27



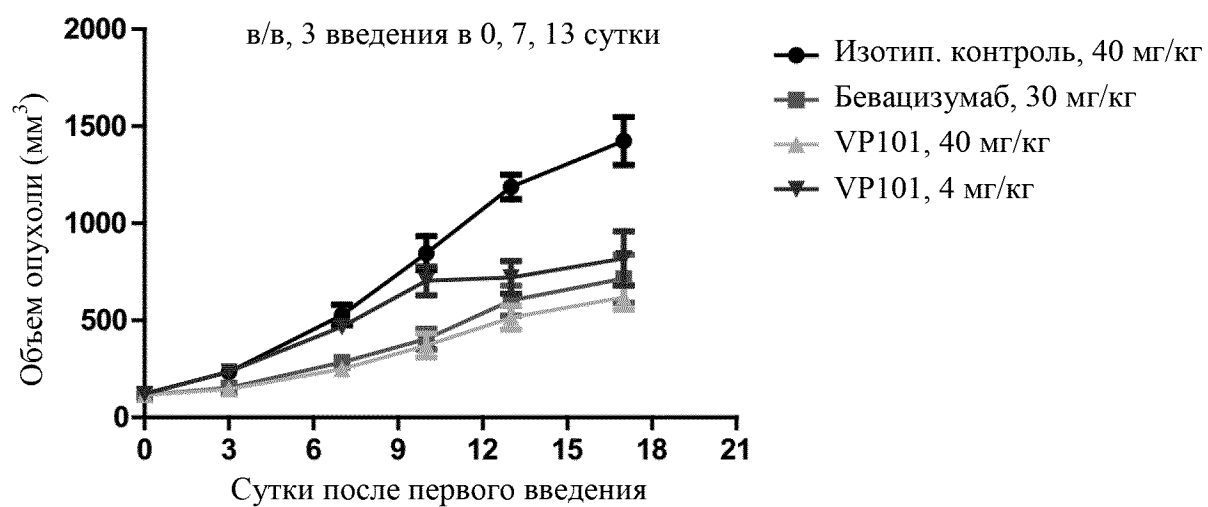
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31

