

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042365**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.08

(21) Номер заявки
201990571

(22) Дата подачи заявки
2017.08.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

**(54) БИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ СТЛА4 И ПРОТИВ PD-1, ЕГО
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 201610705624.2

(32) 2016.08.23

(33) CN

(43) 2019.08.30

(86) PCT/CN2017/098466

(87) WO 2018/036473 2018.03.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКЕСО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(CN)

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

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

(56) CN-A-106967172
CN-A-104974253
WO-A1-2014209804
CN-A-104987421
CN-A-105754990
CN-A-105175544
CN-A-105296433
CN-A-102822198
CN-A-105873615
CN-A-102741423

(MIAO, Miao et al., Role of Programmed
Death-1 (PD-1) in Patients with Aplastic Anemia,
Jiangsu Medical Journal), 35(06), 30 June 2009
(30.06.2009), pages 626-627

(57) Бифункциональное антитело против СТЛА4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4) и против PD-1 (запрограммированная клеточная смерть 1), фармацевтическая композиция и их применение. В частности, бифункциональное антитело против СТЛА4 и против PD-1 содержит первый функциональный домен белка, который нацелен на PD-1, и второй функциональный домен белка, нацеленный на СТЛА-4. Бифункциональное антитело может специфически связываться с СТЛА-4 и PD-1, снижать иммуносупрессию СТЛА4 и PD-1 в организме, в частности активировать Т-лимфоциты и, таким образом, имеет хорошие перспективы применения.

B1**042365****042365****B1**

Область техники

Данное изобретение относится к области терапии опухолей и молекулярной иммунологии. Данное изобретение относится к биспецифическим антителам против CTLA4 и против PD-1, а также к их фармацевтическим композициям и способам применения. В частности, данное изобретение относится к моноклональным антителам против белков CTLA4 и PD-1.

Уровень техники

Цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA4) тесно связан с CD28 по структуре генов, хромосомной локализации, гомологии последовательностей и экспрессии генов, и оба они являются рецепторами костимулирующей молекулы B7 и в основном экспрессируются на клеточной поверхности активированных Т-клеток. Взаимодействие CTLA4 и B7 ингибирует активацию Т-клеток у мышей и человека и негативно регулирует активацию Т-клеток.

Антитело против CTLA4 или лиганд CTLA4 может предотвращать связывание CTLA4 с его природным лигандом, тем самым блокируя передачу негативного сигнала в Т-клетках, индуцированного CTLA4, и усиливая ответ Т-клеток на различные антигены, что было подтверждено в исследованиях как *in vivo*, так и *in vitro*. В настоящее время проводятся клинические испытания антител против CTLA4 для лечения рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени, злокачественной меланомы и т.д. (Grosso JF., Jure-Kunkel MN., CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun. 2013; 13:5. Epub 2013 Jan 22).

Интерлейкин 2 (ИЛ-2), продуцируемый Т-клетками, представляет собой цитокин, регулирующий пролиферацию определенных подгрупп Т-клеток, и важнейший фактор, регулирующий иммунные ответы, способствующий пролиферации активированных В-клеток и участвующий в реакциях антител, гематопоезе и наблюдении за опухолями. Рекомбинантный ИЛ-2 человека был одобрен FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) США для лечения злокачественных опухолей (включая меланому, опухоль почки и т.д.) во время прохождения клинических исследований для лечения хронических вирусных инфекций (Chavez, A.R., et al., Pharmacologic administration of interleukin-2. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182: p.14-27). В экспериментах *in vitro* антитела против CTLA4 могут специфически устранять иммуносупрессию CTLA4, активировать Т-клетки и индуцировать выработку ИЛ-2, демонстрируя многообещающие перспективы в лечении опухолевых и паразитарных заболеваний.

Являясь решающими факторами, влияющими на функции Т-клеток, CTLA4 и антитела против CTLA4 оказывают конкретный терапевтический эффект, воздействуя на иммунную микросреду, демонстрируя высокую эффективность и дополняя традиционные лекарственные средства, создавая тем самым новые возможности в терапии. Терапевтические эффекты CTLA4 и антител против CTLA4 исследовались в различных доклинических и клинических исследованиях, таких как ингибирование гиперчувствительности дыхательных путей на животных моделях астмы, предотвращение развития ревматических заболеваний, индукция иммунной толерантности при аллогенной трансплантации и т.д. Между тем, хотя в краткосрочных клинических испытаниях не было обнаружено побочных эффектов, следует отметить, что потенциальные последствия длительного применения препаратов, нацеленных на CTLA4, таких как антитело против CTLA4, могут спровоцировать аутоиммунные заболевания из-за чрезмерного блокирования сигнального пути CTLA4-B7. Поскольку антитела могут специфически связываться со своими антигенами и вызывать лизис клеток-мишеней или блокировать патологический прогресс, разработка лекарственных препаратов антител, особенно гуманизированных антител, очень важна при лечении злокачественных опухолей или аутоиммунных заболеваний.

Трансмембранный рецептор PD-1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти, также известный как PD-1) является членом семейства генов CD28, экспрессируемых в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Рецепторы PD-1, PDL1 и PDL2 принадлежат к суперсемейству B7; причем PDL1 широко экспрессируется во множестве клеток, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, тогда как PDL2 экспрессируется только в антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

Т-клетки играют важную роль в устранении вирусных инфекций, но противовирусные ответы Т-клеток часто связаны с иммунопатогенезом. Хотя PD-1-опосредованная негативная регуляция активации Т-клеток имеет решающее значение для уменьшения повреждения ткани, вызванного инфекцией, блокирование или ингибирование пути PD-1 может привести к аутоиммунным заболеваниям, например, мыши, нокаутированные по гену PD-1, показали более эффективный клиренс вирусной инфекции поджелудочной железы, но это привело к более серьезному повреждению печени (Iasi et al., 2003, J. Exp. Med, 198, 39-50). Кроме того, опухоли с высокой экспрессией PD-1 часто превращаются в рак, который трудно обнаружить (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3360-5). общепринятый способ регулирования экспрессии PD-1 заключается во введении антител *in vivo*.

В связи с широкими противоопухолевыми перспективами и поразительной эффективностью антител к PD-1, обычно считается, что антитела против метаболических путей PD-1 приведут к прорывам в лечении различных опухолей: немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака яичника,

меланомы (Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Semin Oncol.* 2015 Jun; 42(3): 466-473), лейкоза 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). С момента раскрытия беспрецедентных данных о клинической эффективности на ежегодных совещаниях Американской ассоциации исследований рака (AACR) и Американского общества клинической онкологии (ASCO) в 2012 и 2013 годах антитела против PD-1 стали самыми востребованными новыми лекарственными средствами в исследованиях и разработках в глобальной фармацевтической индустрии.

Интерферон гамма (ИФН- γ) в основном вырабатывается естественными клетками-киллерами (NK) и естественными киллерными Т-клетками (NKT) или продуцируется эффекторными Т-клетками, состоящими из CD4⁺ Th1-клеток и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) после стимуляции специфическими антигенами. Являясь важным цитокином врожденного и приобретенного иммунитета, ИФН- γ играет важную роль в противодействии или ингибировании вирусных, некоторых бактериальных инфекций и инфекций, вызванных простейшими. Между тем, ИФН- γ может активировать макрофаги и индуцировать экспрессию главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) 2 типа, чтобы активировать иммунные ответы для контроля прогрессирования опухолей (Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon-gamma Durin g Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology* 2007; 96: 41-101).

Моноклональные антитела (mAb), нацеленные на один антиген, использовались для лечения рака, воспаления, инфекционных заболеваний и т.д. Однако причина и факторы многих заболеваний *in vivo* сложны, включая повышение или понижение регуляции различных белков, цитокинов или рецепторов в различных сигнальных путях, либо ингибирующих, либо стимулирующих биологические функции. Следовательно, одновременная блокировка разных мишеней может улучшить эффективность лечения, что может быть достигнуто комбинациями лекарственных средств с разными мишенями или посредством одного лекарственного средства с несколькими мишенями, такими как мультиспецифичные антитела.

Биспецифическое антитело, также называемое бифункциональным антителом, нацеленным на два разных антигена одновременно, может быть получено путем очистки с помощью иммунной сортировки, а также с помощью подходящих рекомбинантных технологий с гибкими возможностями оптимизации сайта связывания, формата синтеза и выхода продукции. В настоящее время существует более 45 форм биспецифических антител (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. *BioDrugs* 2010; 24: 89-98). Структура IgG-scFv, названная в честь Моррисона, была использована во многих биспецифических антителах (1997 C010ma MJ, Morrison SL. The Design and production of will be tetravalent bispecific antibodies. *Nat Biotechnol. Nature Biotechnol* 1997; 15, 15, 9-163). Было доказано, что биспецифическое антитело со структурой IgG-scFv является идеальной формой биспецифического антитела с преимуществами в конструировании, экспрессии и очистке антител благодаря своему сходству с природным форматом IgG (Miller BR, Demarest SJ, 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).

Однако биспецифические антитела были разработаны в основном против антигенов на поверхности двух разных клеток, а не против двух разных антигенов в одной и той же клетке. Таким образом, необходимо разработать лекарственное средство на основе биспецифических антител как против PD-1, так и против CTLA4.

Сущность изобретения

Благодаря углубленным исследованиям и творческой работе, путем иммунизации мышей рекомбинантным PD-1 или CTLA4, экспрессируемыми в клетках млекопитающих в качестве антигена, авторы изобретения получили клетки гибридомы путем слияния спленоцитов мыши и клеток миеломы. После скрининга большого количества образцов авторы изобретения получили следующие линии клеток гибридомы, соответственно:

линия клеток гибридомы LT002 (CTLA4-4G10), запатентованная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. с депозитарным номером доступа CCTCC: C201587; и

линия клеток гибридомы LT003 (PD-1-14C12), запатентованная в китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что

линия клеток гибридомы LT002 способна секретировать специфическое моноклональное антитело (названное 4G10), связывающееся специфически с CTLA4, и это моноклональное антитело может эффективно блокировать взаимодействие CTLA4 с B7,

линия клеток гибридомы LT003 способна секретировать специфическое моноклональное антитело (названное 14C12), связывающееся специфически с PD-1, и это моноклональное антитело может эффективно блокировать взаимодействие PD-1 с PDL1.

Кроме того, авторы изобретения новым способом создали гуманизированные антитела против CTLA4 (названные 4G10H1L1, 4G10H3L3, 4G10H4L3 и 8D2H14L2, соответственно) и гуманизированные антитела против PD-1 (названные 14C12H1L1).

Кроме того, авторы изобретения создали серию новых гуманизированных биспецифических анти-тел (названных BiAb001 BiAb002 BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010, соответственно) посредством рекомбинирования двух видов гуманизированных антител, которые могут связывать как CTLA4, так и PD-1 и блокировать взаимодействия CTLA4 с B7 и PD-1 с PDL1. Биспецифические антитела могут эффективно связывать и активировать Т-клетки человека, индуцировать секрецию лимфоцитами ИФН- γ и ИЛ-2, имея потенциал быть приготовленными в виде лекарственных средств для профилактики и лечения раковых заболеваний, таких как рак легкого, меланома, рак почек, рак яичника и лейкоз.

Следующее предусмотрено данным изобретением.

Данное изобретение относится к биспецифическому антителу, в котором первая функциональная область белка нацелена на PD-1, и вторая функциональная область белка нацелена на CTLA4.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанные первая и вторая функциональные области белка связаны непосредственно или посредством соединительных фрагментов; предпочтительно, соединительные фрагменты представляют собой (GGGS) $_n$, а n представляет собой положительное целое число, такое как 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанная первая и вторая функциональные области белка представляют собой, соответственно, иммуноглобулины или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как полуантитело, Fab, F(ab') $_2$ или одноцепочечное антитело.

Предпочтительно, указанная первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а указанная вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или предпочтительно указанная первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а указанная вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором количество первой функциональной области белка или второй функциональной области белка составляет один, два или более, независимо.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанный иммуноглобулин представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM; предпочтительно IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанное одноцепочечное антитело присоединено к с-концу тяжелой цепи иммуноглобулина. Поскольку один иммуноглобулин состоит из двух тяжелых цепей, одна молекула иммуноглобулина связана с двумя одноцепочечными молекулами антитела. Предпочтительно, две указанные молекулы одноцепочечного антитела являются одинаковыми.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором варибельная область тяжелой цепи указанного иммуноглобулина содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31, а варибельная область легкой цепи указанного иммуноглобулина содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34; и/или

варибельная область тяжелой цепи указанного одноцепочечного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35-37, или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 42-44; а варибельная область легкой цепи указанного одноцепочечного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40 или SEQ ID NO: 45-47.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором варибельная область тяжелой цепи указанного иммуноглобулина содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35-37, или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 42-44; а варибельная область легкой цепи указанного иммуноглобулина содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40 или SEQ ID NO: 45-47; и/или,

варибельная область тяжелой цепи указанного одноцепочечного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31; а варибельная область легкой цепи указанного одноцепочечного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи указанного иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи указанного иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 22; и/или

аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи указанного одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 25; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи указанного одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи указанного иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 25; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 27; и/или

аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи указанного одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи указанного иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 22.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанный иммуноглобулин содержит области, отличные от CDR, полученные от видов, отличных от мыши, например от человека.

В одном варианте осуществления изобретения константная область указанного иммуноглобулина является гуманизированной. Например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, ACCESSION: P01834.

В одном варианте осуществления изобретения заявлено биспецифическое антитело, в котором указанное биспецифическое антитело связывается с белком CTLA4 и/или белком PD-1 с K_D , равной менее чем приблизительно 10^{-5} М, такой как, менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее.

Данное изобретение также относится к биспецифическому антителу, варибельная область тяжелой цепи которого содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31, SEQ ID NO: 35-37, или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41, и SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 42-44; и

SEQ ID NO: 32-34, или SEQ ID NO: 38-40, или SEQ ID NO: 45-47; и

варибельная область легкой цепи содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34, или SEQ ID NO: 38-40, или SEQ ID NO: 45-47.

Предпочтительно, CDR в варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи не являются одинаковыми.

Данное изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, способную кодировать варибельную область тяжелой цепи антитела, причем варибельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 29-31, SEQ ID NO: 35-37, или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 42-44; и

выбранными из SEQ ID NO: 32-34, или SEQ ID NO: 38-40, или SEQ ID NO: 45-47.

Данное изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, способную кодировать варибельную область легкой цепи антитела, причем варибельная область легкой цепи указанного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 32-34, или SEQ ID NO: 38-40, или SEQ ID NO: 45-47.

Данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном изобретении.

Данное изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном изобретении, или вектор, описанный в данном изобретении.

Данное изобретение относится к способу получения биспецифических антител, описанных в данном изобретении, путем культивирования клеток-хозяев в данном изобретении в соответствующих условиях и выделения указанных биспецифических антител из культуры клеток.

Данное изобретение относится к конъюогатам, включая биспецифические антитела, описанные в данном изобретении, и к конъюгируемому партнеру в качестве детектируемого маркера. В частности, указанные конъюгируемые партнеры представляют собой радиоактивные изотопы, флуоресцеин, люминесцентные вещества, красители или ферменты.

Данное изобретение относится к наборам реагентов, состоящим из биспецифических антител или конъюогатов, описанных в изобретении.

В частности, наборы реагентов могут содержать вторичное антитело, которое специфически распознает указанное биспецифическое антитело; необязательно указанное вторичное антитело может содержать детектируемые маркеры, такие как радиоактивные изотопы, флуоресцеин, люминесцентные вещества, красители или ферменты.

Данное изобретение относится к применению указанных биспецифических антител, описанных в данном изобретении, для приготовления наборов реагентов для обнаружения наличия или уровней CTLA4 и/или PD-1 в образцах.

Данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанные биспецифические антитела или конъюогаты, описанные в изобретении. Необязательно, она также может содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Данное изобретение относится к применению биспецифических антител или конъюогатов, описанных в изобретении, при изготовлении лекарственных средств, используемых для профилактики и/или лечения опухолей или анемии и/или для диагностики опухолей или анемии; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и лейкоз.

Авторы данного изобретения обнаружили в экспериментах на животных, что биспецифическое антитело ViAb004, описанное в изобретении, может эффективно ингибировать рост опухолевых клеток MC38, инокулированных подкожно в правый бок мышей HuGEMM PD-1, у которых существенно ингибируется увеличение объема опухоли у мышей HuGEMM PD-1.

Данное изобретение относится к применению биспецифических антител или конъюгатов, описанных в данном изобретении, для изготовления лекарственных средств для следующих целей:

- тестирование уровня CTLA4 в образцах,
- блокирование связывания CTLA4 с B7,
- регуляция (например, понижение) активности CTLA4 или уровней CTLA4,
- устранение иммуносупрессии CTLA4,
- активация Т-лимфоцитов, или
- повышение секреции ИЛ-2 в Т-лимфоцитах; и/или
- блокирование связывания PD-1 с PDL1,
- регуляция (например, понижение) активности PD-1 или уровней PD-1,
- устранение иммуносупрессии PD-1,
- повышение секреции ИФН- γ в Т-лимфоцитах.

Данное изобретение относится к способу *in vivo* или *in vitro* применения к клеткам или субъектам, нуждающимся в этом, эффективной дозы биспецифических антител или конъюгатов, описанных в данном изобретении, а указанный способ выбирают из следующего:

- тестирование уровня CTLA4 в образцах,
- блокирование связывания CTLA4 с B7,
- регуляция (например, понижение) активности CTLA4 или уровней CTLA4,
- устранение иммуносупрессии CTLA4,
- активация Т-лимфоцитов, или
- повышение секреции ИЛ-2 в Т-лимфоцитах; и/или
- блокирование связывания PD-1 с PDL1,
- регуляция (например, понижение) активности PD-1 или уровней PD-1,
- устранение иммуносупрессии PD-1, или
- повышение секреции ИФН- γ в Т-лимфоцитах.

В экспериментах *in vitro* в данном изобретении антитела против CTLA4, антитела против PD-1 и биспецифические антитела против CTLA4-против-PD-1, описанные в данном изобретении, все могут индуцировать секрецию ИФН- γ и активировать иммунный ответ.

Данное изобретение относится к способу профилактики и/или лечения опухолей или анемии, и/или диагностики опухолей или анемии, включая процедуры применения к нуждающимся субъектам эффективной дозы биспецифических антител или конъюгатов, описанных в данном изобретении; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника или лейкоз.

Применение биспецифических антител или их конъюгатов, описанных в данном изобретении, для профилактики и/или лечения опухолей или анемии, и/или диагностики опухолей или анемии; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника или лейкоз.

Применение биспецифических антител или их конъюгатов, описанных в данном изобретении, для следующих целей:

- блокирование связывания CTLA4 с B7,
- регуляция (например, понижение) активности CTLA4 или уровней CTLA4,
- устранение иммуносупрессии CTLA4,
- активация Т-лимфоцитов, или
- повышение секреции ИЛ-2 в Т-лимфоцитах; и/или
- блокирование связывания PD-1 с PDL1,
- регуляция (например, понижение) активности PD-1 или уровней PD-1,
- устранение иммуносупрессии PD-1, или
- повышение секреции ИФН- γ в Т-лимфоцитах.

Препараты на основе антител, особенно на основе моноклональных антител (МАВ), показали хорошую эффективность при лечении различных заболеваний. Традиционные способы получения терапевтических антител заключаются в том, чтобы иммунизировать животных антигенами для создания антигенспецифических антител или улучшить низкоаффинные антитела путем созревания аффинности. Однако эти методы отнимают много времени и усилий и часто могут не нацеливаться на конкретные эпитопы на антигене.

Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител определяют связывание антитела с его ан-

тигеном; варибельная область каждой цепи содержит три высоковарибельные области, которые называются областью, определяющей комплементарность (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) состоит из HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи (L) состоит из LCDR1, LCDR2 и LCDR3; названные по Kabat et al., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, пятое издание (1991), 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda штат Мэриленд)).

Использовались обычные методики, известные специалистам в данной области техники, например, для анализа аминокислотных последовательностей CDR в моноклональных антителах, перечисленных в пунктах (1)-(13) в базе данных VBASE2, и результаты были следующие.

(1) 14C12.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 16, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 18.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29),
HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30),
HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31).

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 32),
LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 33),
LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 34).

(2) 14C12H1L1.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 20, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 22.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у 14C12.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у 14C12.

(3) 4G10.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 2, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 4.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35),
HCDR2: INPYNNIT (SEQ ID NO: 36),
HCDR3: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37).

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38),
LCDR2: GTN (SEQ ID NO: 39),
LCDR3: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40).

(4) 4G10H1L1.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 6, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 8.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у 4G10.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у 4G10.

(5) 4G10H3L3.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 10, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 12.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у 4G10.

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у 4G10.

(6) 4G10H4L3.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID

NO: 14, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 12.

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35),
HCDR2: INPYNDIT (SEQ ID NO: 41),
HCDR3: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37).

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у 4G10.

(7) 8D2H14L2.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 25, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 27.

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 42),
HCDR2: IRNKPYNDET (SEQ ID NO: 43),
HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 44).

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 45),
LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 46),
LCDR3: QNVLRSPFTF (SEQ ID NO: 47).

(8) BiAb001.

Аминокислотные последовательности девяти CDR вариабельных областей тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29),
HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30),
HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31),
HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35),
HCDR5: INPYNNT (SEQ ID NO: 36),
HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37),
HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38),
HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 39),
HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40).

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 32),
LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 33),
LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 34).

(9) BiAb002.

Аминокислотные последовательности девяти CDR вариабельных областей тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

(10) BiAb003.

Аминокислотные последовательности девяти CDR вариабельных областей тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

(11) BiAb004.

Аминокислотные последовательности девяти CDR вариабельных областей тяжелой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

Аминокислотные последовательности трех CDR вариабельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

(12) BiAb007.

Аминокислотные последовательности девяти CDR вариабельных областей тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29),
HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30),
HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31),
HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35),

HCDR5: INPYNDIT (SEQ ID NO: 41),
 HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37),
 HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38),
 HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 39),
 HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40).

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

(13) BiAb010.

Аминокислотные последовательности девяти CDR варибельных областей тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29),
 HCDR2: ISGGGRTY (SEQ ID NO: 30),
 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31),
 HCDR4: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 42),
 HCDR5: IRNKPYNDET (SEQ ID NO: 43),
 HCDR6: TAQFAY (SEQ ID NO: 44),
 HCDR7: ENIYGG (SEQ ID NO: 45),
 HCDR8: GAT (SEQ ID NO: 46),
 HCDR9: QNVLRSPFTF (SEQ ID NO: 47).

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи являются одинаковыми с таковыми у BiAb001.

Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с данным изобретением, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, лабораторные методы культивирования клеток и тканей, молекулярной генетики, химии олиго- или полинуклеотидов и иммунологии, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Между тем, чтобы лучше понять данное изобретение, следует понимать, что следующие термины, если не указано иное, имеют следующие значения.

Используемый в данном документе термин "аминокислотная последовательность CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4)" относится не только к полноразмерному белку CTLA4, но также к внеклеточному фрагменту CTLA4 (CTLA4ECD) или фрагментам, содержащим CTLA4ECD, или слитым белкам CTLA4ECD, таким как фрагменты слияний с Fc-фрагментами IgG мыши или человека (mFc или hFc). Однако, специалистам в данной области техники понятно, что аминокислотная последовательность белка CTLA4 может иметь естественные или искусственные мутации или вариации (включая, без ограничения, замены, делеции и/или вставки), не влияющие на его биологические функции. Таким образом, в данном изобретении термин "белок CTLA4" также включает в себя эти аминокислотные последовательности, содержащие природные или искусственные варианты. Кроме того, при ссылке на фрагменты последовательностей белка CTLA4 также включены фрагменты последовательностей, содержащие природные или искусственные варианты.

Используемый в данном документе термин "аминокислотная последовательность белка PD-1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти, NCBI GenBank: 005018 NM)" относится не только к полноразмерному белку PD-1, но также к внеклеточному фрагменту PD-1, PD-1ECD) или фрагментам, содержащим PD-1ECD, или слитым белкам PD-1ECD, таким как фрагменты слияний с Fc-фрагментами IgG мыши или человека (mFc или hFc). Однако, специалистам в данной области техники понятно, что аминокислотная последовательность белка PD-1 может иметь естественные или искусственные мутации или вариации (включая, без ограничения, замены, делеции и/или вставки), не влияющие на его биологические функции. Таким образом, в данном изобретении термин "белок PD-1" также включает в себя эти аминокислотные последовательности, содержащие природные или искусственные варианты. Кроме того, при ссылке на фрагменты последовательностей белка PD-1 также включены фрагменты последовательностей, содержащие природные или искусственные варианты.

Используемый в данном изобретении, если не указано иное, белок B7, описанный в данном документе, представляет собой белок B7-1 и/или B7-2, аминокислотные последовательности которого хорошо известны в предшествующем уровне техники, на которые можно сослаться из существующей литературы или последовательностей, раскрытых в GenBank. Например, B7-1 (CD80, номер гена в NCBI: 941) и B7-2 (CD86, номер гена в NCBI: 942).

Используемый в данном документе термин "EC50" относится к концентрации для обеспечения 50% максимального эффекта.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар пептидов (каждая пара имеет "легкую" (L) цепь и "тяжелую" (H) цепь). В общем, тяжелая цепь может быть понята как полипептидная цепь с более высокой молекулярной массой, тогда как легкая цепь относится к полипептидной цепи с более низкой молекулярной массой. Легкие цепи антитела классифицируются как легкие цепи к или λ , тогда как тяжелые цепи антитела классифи-

цируются как тяжелые цепи μ , δ , γ , α или ϵ , которые определяют изотипы антител как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно.

Внутри легкой и тяжелой цепи переменная область и константная область связаны посредством "J"-области, состоящей из около 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит "D"-область, состоящую из около трех или более аминокислот. Тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из трех структурных доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из структурного домена C_L . Константная область антитела опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные иммунные клетки (например, эффекторные клетки) и компонент Iq комплемента ($C1q$) классической системы комплемента. Области V_H и V_L также могут быть подразделены на области с высокой изменчивостью (называемые областью, определяющей комплементарность (CDR)), которые разделены относительно консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR в порядке FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4 от amino-конца до карбоксильного конца. Переменные области (V_H и V_L) каждой тяжелой/легкой цепи образуют, соответственно, сайты связывания антитела. Распределение аминокислот по областям или доменам соответствует определением в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (Национальный институт здоровья, Бетесда, штат Мэриленд) (1987 и 1991) или Chothia & Lesk (1987) j. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. В частности, тяжелые цепи могут также содержать более трех CDR, например 6, 9 или 12. Например, в случае биспецифических антител по данному изобретению тяжелая цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела IgG с scFv другого антитела, соединенным с его C-концом, таким образом, эта тяжелая цепь содержит 9 CDR. Термин "антитело" не ограничен каким-либо конкретным способом получения антител. Например, он включает в себя, в частности, рекомбинантные антитела, моноклональные антитела или поликлональные антитела. Антитела могут быть разных изоформ, такими как IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающие фрагменты" относится к полипептидам, содержащим фрагменты полноразмерного антитела, сохраняющему способность специфически связываться с тем же антигеном и/или конкурировать с полноразмерным антителом за связывание с антигеном, который также называют "антигенсвязывающей частью". См. Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), включая всю статью и ссылки в данном изобретении для всех целей. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть созданы методами рекомбинантной ДНК или расщеплением интактных антител протеолитическими ферментами или химическими веществами. В некоторых случаях антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb и CDR, одноцепочечные антитела (например, scFv), химерные антитела, диатела и полипептиды, которые, по меньшей мере, содержат часть антитела, достаточную для придания специфической антигенсвязывающей способности.

Используемый в данном документе 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 из одного плеча антитела. Термин "dAb-фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)). Термин "Fab-фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} . Термин " $F(ab')_2$ -фрагмент" относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающие фрагменты антитела представляют собой одноцепочечные антитела (например, scFv), одну полипептидную цепь, состоящую из доменов V_L и V_H , связанных вместе (см., например, Bird et al., Science 242: 423-426 (1988) и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH_2 - V_L -линкер- V_H -COOH или NH_2 - V_H -линкер- V_L -COOH. Подходящий линкер может представлять собой повтор GGGGS или его варианты, например, аминокислотную последовательность (GGGGS)₄ или ее варианты (Holliger et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Другие иллюстративные линкеры были описаны Alfthan, et al., (1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi, et al., (2001) Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu, et al., (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov et al., (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 и Roovers, et al., (2001) Cancer Immunol.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой диатело, а именно димерное антитело, чьи домены V_H и V_L расположены на одной полипептидной цепи, однако из-за использования слишком короткого линкера, чтобы позволить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами в другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) и Poljak R. J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Используя обычные методики, известные специалистам в данной области техники (такие как технология рекомбинантных ДНК или ферментативное/химическое расщепление), антигенсвязывающий фрагмент (такой как описанные выше фрагменты антител) может быть получен из данного антитела и подвержен скринингу на специфичность таким же образом, как и для полноразмерного антитела.

В данном изобретении, если не указано иное, термин "антитело" относится не только к интактному антителу, но также к антигенсвязывающим фрагментам антитела.

Используемые в данном изобретении термины "mAb" и "моноклональные антитела" относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокомолекулярных антител, то есть из группы идентичных молекул антител, за исключением мутаций, которые могут возникать самопроизвольно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональные антитела отличаются от моноклональных антител и содержат, по меньшей мере, 2 или более разных антител, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомной технологии, о которой первоначально сообщалось Kohler et al., (Nature, 256: 495, (1975)), а также технологии рекомбинантных ДНК (см. патент США 4816567).

Используемый в данном изобретении термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором части легкой цепи и/или тяжелой цепи происходят из одного антитела (могут быть из определенного вида или принадлежать к определенному классу или подклассу антител), а другие части легкой цепи и/или тяжелой цепи происходят от другого антитела (могут быть одного и того же или разных видов или принадлежать к одному и тому же или разным классам или подклассам антител). Тем не менее, оно сохраняет антигенсвязывающую активность (патент США Cabilly et al., 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Используемый в данном изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к антителу или его фрагментам, полученным из иммуноглобулина человека (рецепторное антитело), чьи CDR или части CDR заменены областями CDR антитела, полученного не от человека (донорское антитело), причем донорское антитело может представлять собой антитело, не относящееся к антителу человека (например, мыши, крысы или кролика), с предсказуемой специфичностью, аффинностью связывания или реакционной способностью. Кроме того, для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены соответствующими аминокислотными остатками от вида, отличного от человека, или заменены соответствующими аминокислотными остатками других антител. Для более подробной информации о гуманизированных антителах, см., например, Jones, et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992) и Clark, Immunol. Today, 21: 397-402 (2000).

Используемый в данном изобретении термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым иммуноглобулин или антитело могут специфически связываться. "Эпитоп" также известен как "антигенная детерминанта" в данной области техники. Эпитоп или антигенные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, углеводы или гликозидные цепи, и обычно имеют специфические трехмерные структуры, а также специфические характеристики заряда. Например, эпитопы обычно состоят из, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конфигурации, которая может быть "линейной" или "конформационной". См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, volume 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителами) существуют линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности; в то время как в конформационном эпитопе взаимодействующие точки разделены вдоль первичной аминокислотной последовательности.

Используемый в данном изобретении термин "изолят" или "выделенный" означает полученный искусственным путем в естественном состоянии. Если в природе существует "выделенное" вещество или компонент, он может получаться из-за изменения его естественной среды или изолироваться из естественной среды, или и тем, и другим путем. Например, полинуклеотид или полипептид в естественном существовании у живого существа будет называться "выделенным", если он был выделен с высокой степенью чистоты в том же естественном состоянии. Термин "изолят" или "выделенный" не исключает наличия искусственного или синтетического вещества или других примесей, которые не влияют на активность.

Используемый в данном изобретении термин "система экспрессии E. coli" относится к системе экспрессии, состоящей из Escherichia coli (штамм) и вектора, причем E. coli (штамм) является коммерчески доступным, включая, но не ограничиваясь: G1698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3) и BLR (DE3).

Используемый в данном изобретении термин "вектор" относится к средству доставки нуклеиновой кислоты, которое может быть введено с полинуклеотидом. Вектор, который может содержать белок, который кодируется экспрессируемым введенным полинуклеотидом, называется вектором экспрессии. Векторы могут быть введены в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции, поэтому генетические вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны техническому персоналу в данной области техники, включая, без ограничения: плазмиду; фазмиду; космиду; искусственную хромосому, такую как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаг, такой как фаг A или фаг M13, а также вирусы животных и т.д. Вирусы животных могут включать в себя, без ограничения, вирус с обратной транскриптазой (включая лентивирус), адено-

вирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), вирус ветряной оспы, бакуловирус, вирус папилломы и паповавирус (такой как SV40). Вектор может содержать множество компонентов, которые контролируют экспрессию, включая, без ограничения, промотор, фактор инициации транскрипции, энхансер, селективный элемент и репортерный ген. Кроме того, вектор также может содержать сайт инициации репликации.

Используемый в данном изобретении термин "клетка-хозяин" относится к клеткам, которые могут импортировать векторы, включая, без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* и *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как дрожжи и *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 и Sf9, или клетки животных, такие как клетки фибробластов, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки HEK293 или клетки человека.

Используемый в данном изобретении термин "гомологичный" относится к сходству последовательности или идентичности последовательности между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда положение в двух сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или аминокислотой, например, если положение в двух молекулах ДНК занято аденином, то эти молекулы гомологичны в этом положении. "Процентная гомология" двух последовательностей рассчитывается как функция от числа сопоставленных положений двух последовательностей, деленная на общее количество сравниваемых положений, умноженное на 100. Например, если 6 из 10 положений двух последовательностей совпадают, то гомология двух последовательностей составляет 60%. Например, гомология последовательностей ДНК CTGACT и CAGGTT составляет 50% (3 из 6 позиций совпадают). Как правило, сравнение проводится, когда две последовательности выровнены для обеспечения максимальной идентичности. Такое выравнивание может быть просто сгенерировано с использованием компьютерных программ, например, программы ALIGN (DNASTAR, Inc.), реализованной методом Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453. Или, используя алгоритм, предложенный E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988)) который был интегрирован в программу ALIGN (версия 2.0), в котором процент гомологии двух последовательностей рассчитывается с использованием таблицы расчета весов остатков PAM120, штрафа за длину гэпа, равного 12 и штрафа за гэп 4. Кроме того, программу GAP, которая была интегрирована в программный пакет GCG (доступен на www.gcg.com) реализованный с алгоритмом Needleman and Wunsch (*J Mol Biol.* 4-453 (1970)), матрицей Blossum 62, матрицей PAM250 а также весом гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и весом длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6, можно использовать для измерения процентной гомологии двух аминокислотных последовательностей.

Используемый в данном изобретении термин "специфическое связывание" относится к неслучайному связыванию между двумя молекулами, т.е. взаимодействию между антителами и антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающееся с антигеном (или антитело со специфичностью к антигену), относится к тому, что антитело связывает антиген с аффинностью (K_D), меньшей чем приблизительно 10^{-5} М, например, меньшей чем 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или даже меньшей. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "мишень (нацеленный)" относится к специфическому связыванию.

Используемый в данном изобретении термин " K_D " относится к константе равновесия диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, чтобы описать аффинность связывания между антителами и антигенами. Чем меньше константа равновесия диссоциации, тем сильнее антитело связывается с антигеном, тем выше аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитела связывают антигены с константой равновесия диссоциации (K_D), меньшей чем приблизительно 10^{-5} М, в частности, меньшей чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или менее, например, как измерено прибором BIAcore методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Используемые в данном изобретении термины "моноклональные антитела" и "mAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины "поликлональные антитела" и "PcAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины "полипептид" и "белок" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Также в данном изобретении аминокислоты обычно обозначаются однобуквенными или трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть обозначен как A или Ala.

Используемые в данном изобретении термины "гибридома" и "линия клеток гибридомы" используются взаимозаменяемо, и когда используются термины "гибридома" и "линия клеток гибридомы", они также включают в себя субклоны и потомства линии клеток гибридомы. Например, когда ссылаются на линии клеток гибридомы LT002 или LT003, это также относится к субклонам и потомству линий клеток гибридомы LT002 или LT003.

Используемый в данном изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент" относится к носителю и/или эксципиенту, который совместим с субъектом и активными ингредиентами в фармакологии и/или физиологии и известен в данной области техники (например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), включая, без ограничения: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают в себя, без ограничения, фосфатные буферы; поверхностно-активные вещества включают в себя, без ограничения, катионные, анионные или неион-

ные поверхностно-активные вещества, такие как Твин 80; усилители ионной силы включают в себя, без ограничения, хлорид натрия.

Используемый в данном изобретении термин "адъювант" относится к неспецифическому усилителю иммунитета, который при доставке в организм вместе с антигеном или перед ним усиливает или изменяет иммунный ответ организма на антиген. Существует много видов адъювантов, включая, без ограничения, адъюванты алюминия (такие как гидроксид алюминия), адъюванты Фрейнда (такие как полные и неполные адъюванты Фрейнда), *Corynebacterium parvum*, липополисахариды, цитокины и т.д. Адъювант Фрейнда в настоящее время наиболее часто используется в экспериментах на животных. Адъювант гидроксида алюминия используется в основном в клинических испытаниях.

Используемый в данном изобретении термин "эффективная доза" относится к количеству, достаточному для частичного или полного достижения желаемого эффекта. Например, эффективная профилактическая доза (например, заболевания, связанные со связыванием CTLA4 с B7 или гиперактивностью CTLA4, такие как опухоли) определяется как количество терапевтического средства, достаточного для предотвращения, остановки или задержки заболеваний (например, заболеваний, связанных с гиперактивностью связывания CTLA4 с B7, или заболеваний, связанных с гиперактивностью CTLA4, таких как опухоли); эффективная доза для лечения - это количество терапевтического средства для лечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у больных пациентов. Определение такой эффективной дозы полностью находится в пределах возможностей технического персонала в данной области техники. Например, эффективная доза лечения будет зависеть от тяжести заболевания, общего состояния иммунной системы пациента, общего состояния пациентов, такого как возраст, масса и пол, введения лекарственного средства и других сопутствующих методов лечения.

Эффекты изобретения.

Моноклональные антитела по данному изобретению 4G10H1L1 и 4G10H3L3 способны специфически связываться с CTLA4, эффективно блокируя взаимодействие CLTA4 и B7 и устраняя иммуносупрессию CLTA4 для активации Т-лимфоцитов.

Моноклональное антитело 14C12H1L1 способно специфически связываться с CTLA4, эффективно блокируя взаимодействие CTLA4 и B7 и устраняя иммуносупрессию CTLA4 для активации Т-лимфоцитов.

Биспецифические антитела по данному изобретению потенциально могут быть использованы для лекарственных средств для профилактики и/или лечения опухолей, таких как меланома, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и лейкоз.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - результаты ДСН-ПААГ моноклонального антитела 4G10. Слева направо: 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 5 мкл маркера; 1 мкг БСА.

Фиг. 2 - результаты ДСН-ПААГ моноклонального антитела 4G10H1L1. Слева направо: 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 5 мкл маркера.

Фиг. 3 - результаты ДСН-ПААГ моноклонального антитела 4G10H3L3. Слева направо: 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 5 мкл маркера.

Фиг. 4 - результаты ДСН-ПААГ моноклонального антитела 14C12H1L1. Слева направо: 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 5 мкл маркера; 1 мкг БСА.

Фиг. 5 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb001. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

Фиг. 6 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb002. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

Фиг. 7 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb003. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

Фиг. 8 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb004. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

Фиг. 9 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb007. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

Фиг. 10 - результаты ДСН-ПААГ биспецифического антитела ViAb010. Слева направо: 5 мкл маркера; 1 мкг антитела в невозстановленном загрузочном буфере; 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 1 мкг БСА.

- Фиг. 11 - кинетика связывания антитела 4G10.
- Фиг. 12 - кинетика связывания антитела 4G10 H1L1.
- Фиг. 13 - кинетика связывания антитела 4G10H3L3.
- Фиг. 14 - кинетика связывания антитела 4G10H4L3.
- Фиг. 15 - кинетика связывания антитела 14C12.
- Фиг. 16 - кинетика связывания антитела 14C12 H1L1.
- Фиг. 17 - кинетика связывания антитела CTLA4 и антитела BiAb001.
- Фиг. 18 - кинетика связывания антитела CTLA4 и антитела BiAb002.
- Фиг. 19 - кинетика связывания антитела CTLA4 и антитела BiAb003.
- Фиг. 20 - кинетика связывания антитела CTLA4 и антитела BiAb004.
- Фиг. 21 - кинетика связывания антитела CTLA4 и антитела BiAb007.
- Фиг. 22 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb001.
- Фиг. 23 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb002.
- Фиг. 24 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb003.
- Фиг. 25 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb004.
- Фиг. 26 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb007.
- Фиг. 27 - кинетика связывания антитела PD-1 и антитела BiAb010.
- Фиг. 28 - результаты непрямого ИФА связывания 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4.
- Фиг. 29 - результаты конкурентного ИФА связывания 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 против B7.
- Фиг. 30 - результаты непрямого ИФА связывания 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1.
- Фиг. 31 - результаты конкурентного ИФА связывания 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1 против PDL1.
- Фиг. 32 - результаты непрямого ИФА связывания BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с CTLA4.
- Фиг. 33 - результаты непрямого ИФА связывания BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с PD-1.
- Фиг. 34 - результаты конкурентного ИФА связывания BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с CTLA4 против B7.
- Фиг. 35 - результаты конкурентного ИФА связывания BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с PD-1 против PDL1.
- Фиг. 36 - EC50 связывания 4G10H1L1 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 37 - EC50 связывания 4G10H3L3 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 38 - EC50 связывания 14C12H1L1 с PD-1 на поверхности клеток 293T-PD-1.
- Фиг. 39 - EC50 связывания BiAb001 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 40 - EC50 связывания BiAb002 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 41 - EC50 связывания BiAb003 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 42 - EC50 связывания BiAb004 с CTLA4 на поверхности клеток 293T-CTLA4.
- Фиг. 43 - EC50 связывания BiAb001 с PD-1 на поверхности клеток 293T-PD-1.
- Фиг. 44 - EC50 связывания BiAb002 с PD-1 на поверхности клеток 293T-PD-1.
- Фиг. 45 - EC50 связывания BiAb003 с PD-1 на поверхности клеток 293T-PD-1.
- Фиг. 46 - EC50 связывания BiAb004 с PD-1 на поверхности клеток 293T-PD-1.
- Фиг. 47 - активность связывания 4G10H3L3 с поверхностным антигеном CTLA4 Т-клеток.
- Фиг. 48 - активность связывания 14C12H1L1 с поверхностным антигеном PD-1 Т-клеток.
- Фиг. 49 - активность связывания BiAb003 и BiAb004 с поверхностными антигенами Т-клеток по сравнению с активностями 14C12H1L1 и 4G10H3L3.
- Фиг. 50 - эффект 4G10H1L1 и 4G10H3L3 на секрецию ИФН-γ смешанными лимфоцитами.
- Фиг. 51 - эффект 14C12H1L1 на секрецию ИФН-γ смешанными лимфоцитами.
- Фиг. 52 - эффект BiAb001 и BiAb002 на секрецию ИФН-γ смешанными лимфоцитами по сравнению с эффектом 14C12H1L1 и 4G10H1L1.
- Фиг. 53 - эффект BiAb003 и BiAb004 на секрецию ИФН-γ смешанными лимфоцитами по сравнению с эффектом 14C12H1L1 и 4G10H3L3.
- Фиг. 54 - эффект 4G10H3L3 на секрецию ИЛ-2 смешанными лимфоцитами.
- Фиг. 55 - эффект 14C12H1L1 на секрецию ИЛ-2 смешанными лимфоцитами.
- Фиг. 56 - эффект BiAb003 и BiAb004 на секрецию ИЛ-2 смешанными лимфоцитами по сравнению с эффектом 14C12H1L1 и 4G10H3L3.
- Фиг. 57 - эффект 4G10H1L1 и 4G10H3L3 на секрецию ИЛ-2, индуцированную совместным культивированием клеток PBMC, MDA-MB-231 и Raji.
- Фиг. 58 - эффект 14C12H1L1 на секрецию ИЛ-2, индуцированную совместным культивированием клеток PBMC, MDA-MB-231 и Raji.
- Фиг. 59 - эффект BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 на секрецию ИЛ-2, индуцированную совместным культивированием клеток PBMC, MDA-MB-231 и Raji, по сравнению с эффектом 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 14C12H1L1.
- Фиг. 60 - эффект BiAb004 на рост опухоли в модели опухоли MC38 у мышей PD-1 HuGEMM.
- Описание задепонированных биологических материалов LT002 (CTLA4-4G10), линия клеток гиб-

ридомы, задепонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 года. Номер доступа к депозиту: C201587, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

LT003 (PD-1-14C12), линия клеток гибридомы, задепонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 года. Номер доступа к депозиту: C2015105, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

Подробное описание изобретения

Изобретение далее будет описано подробно. Как будет понятно специалисту в данной области техники, следующие примеры используются только для описания изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Случаи без конкретного описания методов или условий были выполнены в соответствии с литературой в данной области техники (например, Guide to Molecular Cloning, под авторством J Sambrook, et al., переведен Peitang Huang, et al., third Edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией по применению продукта. Все реагенты или инструменты без указания изготовителя представляли собой обычные продукты, имеющиеся в продаже.

В вариантах осуществления данного изобретения используемые Т-клетки были получены от Akeso Biopharma, Inc., мыши BALB/C были приобретены в Медицинском центре животных провинции Гуандун. Используемые мыши PD-1 HuGEMM были получены от Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.; клетки MC38 были получены из шанхайского клеточного центра Fudan IBS.

Пример 1. Получение антитела 4G10 против CTLA4.

1) Создание линии клеток гибридомы LT002.

Используя CTLA4-mFc (слитый белок из внеклеточной области белка CTLA4 человека (GenbankID: NP 005205.2) и белка IgG1Fc мыши) в качестве антигена, клетки гибридомы были получены путем слияния спленоцитов иммунизированных мышей BALB/C (приобретенных в Медицинском центре животных провинции Гуандун) и клеток миеломы мыши с помощью известного в настоящее время метода (например, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds.G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Белок CTLA4 получали путем расщепления слитого белка CTLA4-mFc протеазой TEV и дополнительно очищали с помощью колонки для очистки. Микропланшеты, покрытые CTLA4 в качестве антигена, и вышеуказанные клетки гибридомы подвергали скринингу с помощью непрямого ИФА для отбора тех секретирующих новых антител, которые специфически связываются с CTLA4. Клетки гибридомы, подверженные скринингу с помощью непрямого ИФА, дополнительно подвергали скринингу с помощью конкурентного ИФА против лиганда B7-1 (CD80, номер гена в NCBI: 941) и B7-2 (CD86, номер гена в NCBI: 942), чтобы отобрать те секретируемые моноклональные антитела, которые конкурентно связываются с CTLA4, а затем получили стабильную линию клеток гибридомы методом ограниченного разведения. Данная линия клеток гибридомы была названа LT002 (CTLA4-4G10), а ее секретируемое моноклональное антитело было названо 4G10.

LT002 (CTLA4-4G10), линия клеток гибридомы, была задепонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 года. Номер доступа к депозиту: C201587, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2) Получение антитела 4G10 против CTLA4.

Клетки LT002 в данном изобретении культивировали с использованием среды IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG (среда IMDM, содержащая 1% стрептомицина, культивированная в клеточном инкубаторе при 5% CO₂, 37°C), а затем супернатант культуры клеток собирали и очищали с помощью высокоскоростного центрифугирования после 7 суток культивирования, фильтрации через микропористую мембрану и колонку HP с HiTrap белком А для получения антитела 4G10. Очищенный 4G10 идентифицировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, и результат показан на фиг. 1.

Пример 2. Анализ последовательности антитела 4G10 против CTLA4.

Анализ последовательности антитела 4G10 мРНК экстрагировали из линии клеток гибридомы LT002, полученной в примере 1 выше, в соответствии с руководством для набора реагентов для выделения общей клеточной/бактериальной РНК (Tiangen, продукт № DP430).

кДНК синтезировали с использованием системы синтеза первичной цепи Invitrogen Superscript® III для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ТА-клонирование осуществляли непосредственно на амплифицированном продукте ПЦР в соответствии с инструкциями набора для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Продукты ТА-клонирования были непосредственно секвенированы, и результаты секвенирования были следующими.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи: (372 п.о.).

CAGGTC AAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGAT

ATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACCTGGCTACACCATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCAT

GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATAATATTACTAATAACACAGAG

AGTTCATGGGCAAGGCCACATTTACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCT
CAGACTGACATCTGAAGACTCTGGAGTCTATTTCTGTGCAAGACTCGACTATAGGTCTTATTGG
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT (SEQ
ID NO: 1)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (124 а.к.).

QVKLQESGPPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNNITN
YNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSED SGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSAAKTPPSV
Y (SEQ ID NO: 2)

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи: (378 п.о.).

CAGGCTGTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACT
CACTTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTTTGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
CCAGATCATTTATTCACTAGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCA
GATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGA
TGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCATTTGGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAAA
CTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCAAGGGCAATTCTGC (SEQ
ID NO: 3)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (126 а.к.).

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNNRAPG
VPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFQG
QFC (SEQ ID NO: 4)

Пример 3. Дизайн и получение гуманизированных антител 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 против CTLA4.

1) Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепи гуманизированных антител 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 против CTLA4.

На основании трехмерной кристаллической структуры белка CTLA4 (Nat. Struct. Biol., (1997) 4 р.527) и аминокислотной последовательности антитела 4G10, полученной в примере 2, было выполнено моделирование антитела *in silico*, и были сконструированы мутации аминокислот от мышиных до человеческих, чтобы получить аминокислотные последовательности вариательных областей антитела 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 (константная область тяжелой цепи представляла собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857, а константная область легкой цепи представляла собой С-область цепи каппа Ig, ACCESSION: P01834).

Спроектированные последовательности вариательных областей являются следующими.

(1) Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 4G10H1L1.

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи: (345 п.о.).

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCCGAGCTGGTGAAGCCCGCGCCTCCATGAAGAT
CTCTTGCAAGGCCAGCGGATACAGTTTCACTGGCTATACCATGAACTGGGTCAAACAGGCTCCA
GGACAGGGACTGGAGTGGATCGGGCTGATTAATCCTTACAACAACATCACCACCTACAACCAGA
AGTTCATGGGAAAAGCAACCTTTACAGTGGACAAGAGCATTTCCACAGCCTACATGGAACGTGAG
CCGGCTGACTTCAGACGATAGCGGGTCTATTTTGTGCAAGGCTGGATTATCGCTCTTACTGG
GGGCAGGGAACCTCTGGTCACTGTCTCCGCT (SEQ ID NO: 5)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (115 а.к.).

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINPYNNITN
YNQKFMGKATFTVDKSI STAYMELSRLLTSDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA (SEQ ID
NO: 6)

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи: (327 п.о.).

CAGGCTGTCGTCACCTCAGGAACCTTCACTGACTGTGAGCCAGGAGGAACGTCAACCT
GACATGCGGAAGCTCCACCGAGCAGTGACCACATCCAACCTTCGCCAATTGGGTCCAGGAAAAG
CCAGGCCAGGCATTTCGATCCCTGATCGGAGGCACAAACAATCGGGCTTCTTGGGTGCCCCGAA
GATTCTCAGGAAGCCTGCTGGGGGGAAAAGCCGCTCTGACCATTAGTGGCGCTCAGCCTGAGGA
CGAAGCCGAGTACTTCTGCGCTCTGTGGTATAGCAACCACTGGGTGTTTGGCGGGGAACAAAG
CTGACTGTGCTG (SEQ ID NO: 7)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (109 а.к.).

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFWVQEKPGQAFRSLIGGTNNRASW

VPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 8)

(2) Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 4G10H3L3.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи: (345 п.о.).

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCTCAGTGAAGGT

CAGCTGCAAGGCCAGCGGTACAGTTTCACTGGATATACCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCT

GGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTAACCCCTACAACAACATCACTAACTACGCACAGA

AGTTCCAGGGGAGAGTGACCTTTACAGTGGACACCAGCATTTCCACAGCCTACATGGAAGTGT

CCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGTACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAGCTATTGG

GGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA (SEQ ID NO: 9)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (115 а.к.).

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNNITN

YAKKFQGRVTFVTDSISTAYMELSRRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA (SEQ ID

NO: 10)

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи: (327 п.о.).

CAGGCTGTCGCTCACTCAGGAACCTTCACTGACCGTGTCTCCTGGCGGGACTGTACCCCT

GACATGCGGCAGCTCCACAGGGGCCGTGACCACAAGTAACTTCCCAAATTGGGTCCAGCAGAAG

CCAGGACAGGCTCCCGGAGTCTGATCGGAGGCACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCAC

GGTTCAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAGGCCGCTCTGACAATTAGCGGAGCCCAGCCTGAGGA

CGAAGCCGAGTACTATTGCGCTCTGTGGTACTCCAACCACTGGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAG

CTGACTGTGCTG (SEQ ID NO: 11)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (109 а.к.).

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFWVQKPGQAPRSLIGGTNNKASW

TPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:

12)

(3) Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 4G10H4L3.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи: (345 п.о.).

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCTCAGTGAAGGT

CAGCTGCAAGGCCAGCGGTACAGTTTCACTGGATATACCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCT

GGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTAACCCCTACAACGACATCACTAACTACGCACAGA

AGTTCCAGGGGAGAGTGACCTTTACAGTGGACACCAGCATTTCCACAGCCTACATGGAAGTGT

CCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGTACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAGCTATTGG

GGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA (SEQ ID NO: 13)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (115 а.к.).

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNDITN

YAKKFQGRVTFVTDSISTAYMELSRRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA (SEQ ID

NO: 14)

Последовательности нуклеиновых кислот и кодируемых аминокислот варибельной области легкой цепи такие же, как у 4G10H3L3.

2) Получение гуманизированных антител 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3.

Константная область тяжелой цепи представляла собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857. Константная область легкой цепи представляла собой С-область цепи каппа Ig, ACCESSION: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 4G10H1L1, 4G10H3L3, 4G10H4L3 были отдельно клонированы в векторы pUC57simple для получения pUC57simple-4G10H1 и pUC57simple-4G10L1, pUC57simple-4G10H3 и pUC57simple-4G10L3, а также pUC57simple-4G10H4 и pUC57simple-4G10L3, соответственно. Они были субклонированы в векторы pcDNA3.1. Рекombинантные плазмиды трансфицировали в клетки 2 93F, и культуральную среду собирали и очищали для получения гуманизированных антител 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3. Очищенные 4G10H1L1 и 4G10H3L3 были идентифицированы с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, и результат был показан на фиг. 2 и 3, соответственно.

Пример 4. Получение антитела 14C12 против PD-1.

1) Создание линии клеток гибридомы LT003.

Используя PD-1-mFc в качестве антигена, клетки гибридомы были получены путем слияния спленоцитов иммунизированных мышей BALB/C (приобретенных в Медицинском центре животных провинции Гуандун) и клеток миеломы мыши с помощью известного в настоящее время метода (например, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds.G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Микропланшет покрывали PD-1-mFc в качестве антигена, и для скрининга клеток гибридомы, секретирующих новые антитела, специфически связывающиеся с PD-1, использовали непрямой ИФА.

Клетки гибридомы дополнительно подвергали скринингу с помощью конкурентного ИФА для отбора тех секретирующих антител, которые конкурентно связываются с PD-1 против лиганда PDL1-hFc (PDL1 Genbank ID:NP_054862.1), и затем методом ограниченного разведения была получена стабильная линия клеток гибридомы LT003 (PD-1-14C12), и ее секретируемое моноклональное антитело было названо 14C12.

LT003 (PD-1-14C12), линия клеток гибридомы, была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 года. Номер доступа к депозиту: C2015105, адрес депозитара: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2) Получение антитела 14C12 против PD-1.

Клетки LT003 в данном изобретении культивировали с использованием среды IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG (среда IMDM, содержащая 1% стрептомицина, культивированная в клеточном инкубаторе при 5% CO₂, 37°C), и через 7 суток культивирования супернатант культуры клеток собирали и очищали, чтобы получить антитело 14C12.

Пример 5. Получение последовательности антитела 14C12.

Получение последовательности антитела 14C12 мРНК экстрагировали из линии клеток гибридомы LT003, полученной в примере 4 выше, в соответствии с руководством для набора реагентов для выделения общей клеточной/бактериальной РНК (Tiangen, продукт № DP430).

кДНК синтезировали с использованием системы синтеза первичной цепи Invitrogen Superscript® III для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ТА-клонирование осуществляли непосредственно на амплифицированном продукте ПЦР в соответствии с инструкциями набора для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Продукты ТА-клонирования были непосредственно секвенированы, и результаты секвенирования были следующими.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи: (354 п.о.).

GAGGTCAAACGGGTGGAGAGCGCGCGGGCTGGTGAAGCCGCGGGTCACTGAAAC
GAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCT
GAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACTATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACT
CTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTC
TAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTT
GCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 15)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (118 а.к.).

EVKLVESGGGLVKPGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRITY
YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLSRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ
ID NO: 16)

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи: (318 п.о.).

GACATTAAGATGACACAGTCCCTTCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGAC
CTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGC
AAAAGCCCCAAGACCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCT
CCGGATCTGGCAGTGGGCGAGGATTAATCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGG
CATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAACCTGGAA
CTG (SEQ ID NO: 17)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (106 а.к.).

DIKMTQSPSSMYASLGERVFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP
SRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (SEQ ID NO: 18)

Пример 6. Дизайн, получение и анализ гуманизированного антитела 14C12H1L1 против PD-1.

1) Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1.

По данным трехмерной кристаллической структуры белка PD-1 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704-6) и аминокислотной последовательности антитела 14C12, полученной в примере 5, было выполнено моделирование ан-

титела *in silico*, и были сконструированы мутации аминокислот от мышиных до человеческих, чтобы получить аминокислотные последовательности переменных областей антитела 14C12H1L1.

Спроектированные последовательности переменных областей являются следующими.

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи: (354 п.о.).

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGCGGGTCACTGCGACT
GAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCACCA
GGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACA
GCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAA
CAGCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGAAGCATGGTTT
GCCTATTGGGGGACAGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 19)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (118 а.к.).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWWATISGGGRYTY
YPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTIVTVSS (SEQ
ID NO: 20)

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи: (321 п.о.).

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTCCTCCATGTCCGCTCTGTGGGCGACAGGGTCAC
CTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGG
AAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCA
GTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGC
AACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAG
CTGAAG (SEQ ID NO: 21)

Кодируемая аминокислотная последовательность: (107 а.к.).

DIQMTQSPSSMSASVGDRVFTFCRASQDINTYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVSGVP
SRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 22)

2) Получение и ДСН-ПААГ-электрофорез гуманизированного антитела 14C12H1L1.

Константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857, а константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, ACCESSION: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 14C12H1L1 отдельно клонировали в вектор pCDNA3.1 для получения рекомбинантных экспрессионных плазмид. Рекомбинантные плазмиды были трансфицированы в клетки 293F. Среду для культивирования клеток 293F очищали и тестировали. Как показано на фиг. 4, восстановленный целевой белок появился приблизительно при 24,5 и 49 кДа, в то время как невосстановленный целевой белок появился приблизительно при 147 кДа.

Пример 7. Дизайн последовательности, экспрессия и анализ тяжелых цепей и легких цепей биспецифического антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010.

1) Дизайн последовательности.

Биспецифические антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 в данном изобретении все принадлежат конструкции Моррисона (IgG-scFv), в которой каждая тяжелая цепь антитела IgG связана с фрагментом scFv другого антитела. Конфигурации тяжелых цепей и легких цепей показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Конфигурации тяжелых цепей и легких цепей BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010

Биспецифическое антитело	Тяжелые цепи			Легкие цепи
	IgG	Линкерный фрагмент	scFv	
BiAb001	14C12H1	Линкер 1	4G10H1 _v - Линкер 2 -4G10L1 _v	14C12L1
BiAb002	14C12H1	Линкер 2	4G10H1 _v - Линкер 2-4G10L1 _v	14C12L1
BiAb003	14C12H1	Линкер 1	4G10H3 _v - Линкер 2 -4G10L3 _v	14C12L1
BiAb004	14C12H1	Линкер 2	4G10H3 _v - Линкер 2 -4G10L3 _v	14C12L1
BiAb007	14C12H1	Линкер 2	4G10H4 _v - Линкер 2 -4G10L3 _v	14C12L1
BiAb010	14C12H1	Линкер 2	8D2H14 _v - Линкер 2 -8D2L2 _v	14C12L1

В таблице 1:

(1) последовательности антител, отмеченные индексом "V", относятся к варибельной области тяжелых цепей или легких цепей. Те, у которых нет индекса "V", представляют собой полноразмерные тяжелые цепи или легкие цепи с константной областью. Эти варибельные области или полноразмерные последовательности аминокислот и их кодирующие последовательности нуклеиновых кислот включают в себя соответствующие последовательности, записанные в приведенных выше примерах;

(2) аминокислотная последовательность линкера 1 представляет собой (GGGGS)3 (SEQ ID NO: 23), аминокислотная последовательность линкера 2 представляет собой (GGGGS)4 (SEQ ID NO: 24);

(3) аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 8D2H14L2 (8D2H14_v)

EVQLVESGGGLVQPGGSSRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPGKGLEWLAQIRNKPYNYE
TYYASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID
NO: 25)

кодируемая последовательность нуклеиновой кислоты 8D2H14_v

GAGGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGAAGCTCCCGGCT
GTCATGTGCCCTAGCGGCTTCACCTTTTCCGACAACCTGGATGAATTGGGTGCGACAGGCACCA
GGCAAAGGACTGGAGTGGCTGGCTCAGATCCGGAACAAGCCCTACAATTATGAAACATACTATA
GCGCCTCCGTGAAAGGCCGGTTCACCTATTAGTAGAGACGATTCTAAGAACAGCGTGACCTGCA
GATGAATAGCCTGAAGACAGAGGATACTGGCGTCTACTATTGCACAGCACAGTTTGCCTATTGG
GGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 26)

(4) аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 8D2H14L2 (8D2L2_v)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTSENIYGGNLWYQRKPGKSPKLLIYGATNLSAGSVS
SRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDVATYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 27)

кодируемая последовательность нуклеиновой кислоты 8D2L2_v

GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTCAAGCCTGTCTGCAAGTGTGGGCGATAGGGTCAC
CATCACATGTGCGACCTCCGAAAACATCTACGGGGGACTGAATTGGTATCAGCGCAAGCCCGGC
AAATCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCTACCAACCTGGCATCTGGGGTGTCTCTCGATTTT
CAGGGAGCGGCAGCGGCACCGACTATACTCTGACCATTAGTTCACTGCAGCCTGAGGATGTGGC
CACATACTATTGCCAGAATGTCTGAGATCACCATTCACCTTTTGGGAGCGGAACCAAACTGGAA
ATTAAG (SEQ ID NO: 28)

2) Экспрессия и очистка антитела BiAb001.

кДНК тяжелой цепи и легкой цепи BiAb001 отдельно клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные GenScript) для получения плазмид pUC57simple-BiAb001H и pUC57simple-BiAb001L, соответственно.

pUC57simple-BiAb001H и pUC57simple-BiAb001L индивидуально расщепляли ферментами (HindIII и EcoRI), а гены тяжелой цепи и легкой цепи, выделенные с помощью электрофореза, субклонировали в вектор pCDNA3.1, соответственно. Рекомбинантные плазмиды были экстрагированы и котрансфициро-

ваны в клетки 293F. Через 7 суток культивирования супернатант культуры клеток собирали путем высокоскоростного центрифугирования и концентрирования, очищали путем загрузки в колонку HP с HiTrap белком А и элюирования буфером для элюции за один этап с получением антитела и хранили в PBS.

Очищенные образцы антител добавляли в загрузочный буфер для электрофореза восстановленных белков и в загрузочный буфер для электрофореза невосстановленных белков, соответственно. После кипячения образцы исследовали на ДСН-ПААГ-электрофорезе. Результаты электрофореза BiAb001 показаны на фиг. 5, на которой образец восстановленного белка появился при 23,6 и 75,8 кДа, а образец невосстановленного белка (отдельное антитело) появился при 199 кДа.

3) Экспрессия и очистка антител BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010.

Очищенные антитела BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 были получены в соответствии с вышеупомянутыми способами, использованными для получения BiAb001.

Очищенные образцы антител добавляли в загрузочный буфер для электрофореза восстановленных белков и в загрузочный буфер для электрофореза невосстановленных белков, соответственно. После кипячения образцы исследовали на ДСН-ПААГ-электрофорезе. Результаты электрофореза BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 были показаны на фиг. 6, 7, 8, 9 и 10, соответственно, в которых образец восстановленного белка появился при 23,6 и 75,8 кДа, а образец невосстановленного белка (индивидуальное антитело) появился при 199 кДа.

Пример 8. Определение кинетики связывания антител.

Кинетику связывания антигена и антитела измеряли с помощью прибора молекулярного взаимодействия Fortebio.

1) Была измерена кинетика связывания антитела 4G10 и его гуманизированного антитела 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 с антигеном CTLA4.

1.1) Антиген CTLA4 получали путем расщепления CTLA4-mFc протеазой TEV и очистки на колонке.

1.2) Антитело 4G10 иммобилизовали в биосенсорах AR2G методом связывания с аминами, а затем блокировали этаноламином и уравнивали в PBST, а затем связывали с CTLA4. CTLA4 разбавляли двойным градиентом PBST до концентраций 268,1, 134,1, 67, 33,5, 16,8, 8,38, 4,19 и 0 нМ. Диссоциацию также проводили в PBST. Гуманизированные антитела 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 измеряли способами, подобными способам для 4G10, с концентрациями антигена 180, 90, 45, 22,5, 11,25, 5,625, 2,813 и 0 нМ.

1.3) Кинетика связывания антитела 4G10 и его гуманизированных антител 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 4G10H4L3 с антигеном CTLA4 показана в таблице 1 ниже и на фиг. 11, 12, 13 и 14, соответственно.

2) Кинетика связывания антитела 14C12 и его гуманизированного антитела 14C12H1L1 с антигеном PD-1.

2.1) Антиген PD-1 получали путем расщепления PD-1-mFc протеазой TEV и очистки на колонке.

2.2) Антиген PD-1 (концентрация антигена 1 мкг/мл) был иммобилизован на поверхности сенсора SA после того, как он был мечен биотином, и после уравнивания в PBST он связывался с антителами 14C12 и 14C12H1L1, соответственно. Антитела разводили PBST от 200 нМ до трехкратного снижения каждый раз, а диссоциацию также проводили в PBST.

2.3) Кинетика связывания антител 14C12 и 14C12H1L1 с антигеном показана в таблице 1 ниже и на фиг. 15 и 16.

3) Кинетика связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 с антигеном CTLA4.

3.1) CTLA4 (концентрация антигена 1 мкг/мл) был иммобилизован на поверхности сенсора SA после того, как он был мечен биотином, и после уравнивания в PBST он связывался с антителами BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010, соответственно. Антитела разводили PBST от 200 нМ до трехкратного снижения каждый раз. Диссоциацию также проводили в PBST.

3.2) Кинетика связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 с антигеном CTLA4 показана в табл. 1 и на фиг. 17-21, соответственно.

4) Кинетика связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 с антигеном PD-1.

4.1) Антиген PD-1 (концентрация антигена 1 мкг/мл) был иммобилизован на поверхности сенсора SA после того, как он был мечен биотином, и после уравнивания в PBST он связывался с антителами BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010, соответственно. Антитела разводили PBST от 200 нМ до трехкратного снижения каждый раз. Диссоциацию также проводили в PBST.

4.2) Кинетика связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003, BiAb004, BiAb007 и BiAb010 с антигеном PD-1 показана в табл. 2 и на фиг. 22-27, соответственно.

Таблица 2. Параметры кинетики связывания антител с антигеном

Антитело	Антиген	K_D (М)	K_{on} (1/мс)	Ошибка K_{on}	K_{dis} (1/с)	Ошибка K_{dis}
4G10	CTLA4	3,01E-10	3,78E+05	4,36E+03	1,14E-04	5,33E-06
4G10 H1L1		1,52E-09	1,86E+05	3,26E+03	2,82E-04	9,23E-06
4G10 H3L3		4,14E-09	2,09E+05	3,81E+03	8,64E-04	1,11E-05
4G10H4L3		9,67E-10	1,37E+05	2,22E+03	1,32E-04	8,69E-06
14C12	PD-1	1,81E-11	3,38E+05	8,23E+03	6,12E-06	1,04E-05
14C12H1L1	1 мкг/мл	2,42E-11	3,17E+05	5,90E+03	7,66E-06	8,70E-06
BIAb001	CTLA4	1,67E-10	2,33E+05	4,45E+03	3,89E-05	8,75E-06
BIAb002		9,69E-11	2,37E+05	5,32E+03	2,30E-05	9,97E-06
BIAb003		3,95E-10	3,60E+05	7,10E+03	1,42E-04	9,99E-06
BIAb004		5,66E-10	2,20E+05	3,89E+03	1,24E-04	8,27E-06
BiAb007	PD-1	2,72E-10	1,58E+06	5,17E+04	4,28E-04	1,12E-05
BiAb010		3,22E-10	1,08E+06	1,99E+04	3,47E-04	7,28E-06
BIAb001		4,16E-11	2,97E+05	4,96E+03	1,24E-05	8,36E-06
BIAb002		3,33E-11	2,20E+05	5,93E+03	7,32E-06	1,15E-05
BIAb003	1 мкг/мл	4,12E-11	2,64E+05	5,49E+03	1,09E-05	9,82E-06
BIAb004		4,82E-11	2,47E+05	5,45E+03	1,19E-05	9,61E-06
BiAb007		1,40E-11	4,52E+05	9,23E+03	6,30E-06	7,85E-06
BiAb010		2,97E-11	2,28E+05	4,40E+03	6,79E-06	8,70E-06

K_D представляет собой константу аффинности;

K_{on} представляет собой скорость ассоциации антиген-антитело;

K_{dis} представляет собой скорость диссоциации антиген-антитело;

$K_D = K_{dis}/K_{on}$.

Результаты показали, что:

антитело 4G10 и его гуманизированные антитела обладают хорошей аффинностью к антигену CTLA4,

оба антитела 14C12 и 14C12H1L1 обладают хорошей аффинностью к антигену PD-1, биспецифические антитела обладают хорошей аффинностью к антигену CTLA4 и PD-1.

Пример 9. Активность связывания антитела с антигеном, измеренная с помощью ИФА.

1) Активность связывания гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с антигеном CTLA4.

1.1) Активность связывания гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 определяли путем непрямого ИФА.

После инкубации с антигеном при 4°C в течение ночи микропланшет блокировали 1% БСА при 37°C в течение 2 часов, а затем добавляли антитела и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, а затем добавляли меченное HRP (пероксидаза хрена) вторичное антитело (козий анти-человеческий IgG (H+L)) (Jackson, 10 9-035-088) и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. TMB (Neogen, 308177) добавляли для реакции в течение 5 мин. Абсорбцию считывали при длине волны 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов.

Результаты связывания показаны на фиг. 28. Как показано на фигуре, оба антитела 4G10H1L1 и 4G10H3L3 могут эффективно связываться с белком CTLA4 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 3. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения было определено, что EC50 4G10H1L1 и 4G10H3L3 составляет 0,048 и 0,067 нМ, соответственно.

Таблица 3. Активность связывания 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4, измеренная с помощью непрямого ИФА

Покрывающий антиген: CTLA4 0,5 мкг/мл				
Серийное разбавление антитела	4G10 H1L1		4G10 H3L3	
6 мкг/мл	2,926	2,946	2,809	2,764
1:5	2,784	2,732	2,729	2,739
1:25	2,729	2,688	2,668	2,617
1:125	2,490	2,469	2,367	2,309
1:625	1,736	1,709	1,498	1,357
1:3126	0,607	0,663	0,513	0,432
1:16525	0,198	0,225	0,175	0,149
1:78125	0,096	0,115	0,089	0,087
1:390625	0,075	0,087	0,075	0,072
1:1953125	0,071	0,090	0,066	0,077
1:9765625	0,066	0,087	0,078	0,089
0	0,073	0,079	0,079	0,068
Вторичное антитело	Козий анти-человеческий IgG, HRP (1:5000)			

1.2) Активность связывания гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 посредством конкурентного ИФА против B7.

Нанесение антигена на микропланшет с помощью B7/1-hFc (B7/1 genbank ID: NP 005182.1) при 4°C в течение ночи, а затем после блокирования 1% БСА в течение 2 часов, добавляли смеси антител и антитела CTLA4-mFc (разбавленные концентрации показаны в табл. 4) и инкубировали в течение 30 мин. при 37°C; а затем добавляли вторичное антитело, меченное ферментом, и затем инкубировали в течение 30 мин. при 37°C. Величину поглощения 450 нм измеряли на приборе для мечения ферментом (см. табл. 4).

Результаты связывания антител с CTLA4, конкурирующим с B7-1, показаны на фиг. 29. Как показано на фигуре, антитела 4G10H1L1 и 4G10H3L3 могут конкурировать с B7-1 и эффективно связываться с белком CTLA4 с зависимостью от дозы. Поглощение при разных дозах показано в табл. 4. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения было определено, что EC50 связывания 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 составляет 1,297 и 1,229 нМ, соответственно.

Таблица 4. Активность связывания гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 посредством конкурентного ИФА против B7

Покрывающий антиген: B7/1-hFc 0,5 мкг/мл			
Серийное разбавление	4G10H1L1	4G10H3L3	рецептор

антитела					
3 мкг/мл	0,132	0,121	0,146	0,185	CTLA4-mFc 0,3 мкг/мл
1:3	0,120	0,170	0,159	0,182	
1:9	0,260	0,343	0,382	0,340	
1:27	0,399	0,593	0,570	0,507	
1:81	0,565	0,614	0,642	0,642	
1:243	0,628	0,753	0,784	0,773	
1:729	0,573	0,760	0,768	0,702	
1:2187	0,553	0,824	0,741	0,788	
1:6561	0,661	0,844	0,824	0,679	
1:19683	0,555	0,834	0,742	0,699	
1:59049	0,552	0,725	0,773	0,770	
0	0,610	0,665	0,822	0,717	
Вторичное антитело	Козий анти-мышинный IgG, HRP (1:5000)				

2) Активности связывания моноклонального антитела 14C12 и его гуманизированного антитела 14C12H1L1 с антигеном PD-1, измеренные методом ИФА.

2.1) Активность связывания моноклональных антител 14C12 и 14C12H1L1 с антигеном PD-1 определяли с помощью непрямого ИФА следующим образом.

После инкубации с PD-1-mFc при 4°C в течение ночи микропланшет блокировали 1% БСА при 37°C в течение 2 часов, а затем добавляли антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, а затем добавляли меченное HRP (пероксидаза хрена) вторичное антитело (козий анти-человеческий IgG (H+L)) (Jackson, 10 9-035-088) и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. TMB (Neogen, 308177) добавляли для реакции в течение 5 мин. Абсорбцию считывали при длине волны 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов.

Результаты связывания антител 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1 показаны на фиг. 30. Очевидно, что оба антитела 14C12 и 14C12H1L1 могут эффективно связываться с белком PD-1 с зависимостью от дозы. Поглощение при разных дозах показано в табл. 5. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения было определено, что EC50 связывания 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1 составляет 0,175 и 0,043 нМ, соответственно.

Таблица 5. Активности связывания антител 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1, соответственно

Покрывающий антиген: PD-1-mFc (0,5 мкг/мл)				
Концентрация антитела (мкг/мл)	14C12		14C12H1L1	
1	2,463	2,439	2,643	2,557
0,3	2,572	2,380	2,734	2,586
0,1	2,118	2,126	2,633	2,535
0,03	1,607	1,438	2,384	2,335
0,01	0,930	0,809	1,892	1,839
0,003	0,407	0,346	1,115	1,011
0,001	0,167	0,150	0,503	0,455
0	0,062	0,047	0,068	0,064
Вторичное антитело	Козье анти-мышинное вторичное антитело, HRP-конъюгат			

2.2) Активность связывания моноклонального антитела 14C12, продуцируемого гибридомой, и его гуманизированного антитела 14C12H1L1 с антигеном PD-1 путем конкурентного ИФА против PDL1 измеряли следующим образом.

После инкубации с PD-1-hFc или PD-1-mFc при 4°C в течение ночи, микропланшет блокировали 1% БСА при 37°C в течение 2 часов; и затем смеси отдельных антител, 14C12 или 14C12H1L1, в различных концентрациях (градиент разбавления см. в табл. 6) и PDL1-hFc или PDL1-mFc добавляли в микропланшет для реакции в течение 10 мин; и затем добавляли меченное HRP вторичное антитело и инкубировали

при 37°C в течение 30 мин. Абсорбцию считывали при длине волны 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов (см. табл. 6).

Результаты связывания антител с PD-1, конкурирующим с PDL1, показаны на фиг. 31, антитело 14C12 и его гуманизированное антитело 14C12H1L1 могут конкурировать с PDL1 за эффективное связывание с белком PD-1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 6. Используя количественный анализ значений поглощения, EC50 связывания 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1, которые были рассчитаны с помощью моделирования кривой, были затем определены как 0,853 и 0,37 нМ, соответственно.

Таблица 6. Активность связывания 14C12 и 14C12H1L1 с PD-1 посредством конкурентного ИФА против PDL1

Антитело концентрация (мкг/мл)	Покрывающий антиген: PD-1-mFc 0,2 мкг/мл			
	14C12		14C12H1L1	
1,5 мкг/мл	0,111	0,088	0,135	0,113
1:3	0,100	0,116	0,130	0,131
1:9	0,645	0,643	0,260	0,185
1:27	1,463	1,614	0,257	0,218
1:81	1,841	1,686	0,355	0,350
1:243	1,983	1,769	0,399	0,364
1:729	1,789	1,770	0,417	0,411
0	1,791	1,790	0,430	0,402
PDL1-hFc 2 мкг/мл				
Вторичное антитело	Козье анти-мышинное вторичное антитело HRP-конъюгат			

3) Активность связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигенами, измеренная методом ИФА.

3.1) Активность связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном CTLA-4 определяли с помощью непрямого ИФА (см. методы, описанные в пункте 1.1 данного примера).

Результаты связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном CTLA4 показаны на фиг. 32. Очевидно, что антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно связываться с белком CTLA4 с зависимостью от дозы. Поглощение при разных дозах показано в табл. 7. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения EC50 антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с CTLA4, затем определяли, как показано в табл. 7 ниже.

Таблица 7. Активность связывания биспецифических антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном CTLA4 (непрямой ИФА)

Серийное разбавление антитела	Покрывающий антиген: CTLA4 0,5 мкг/мл							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6 мкг/мл	2,425	2,098	2,334	2,120	2,179	2,076	2,243	2,251
1:3	2,299	2,234	2,204	2,257	2,141	2,138	2,198	2,319
1:9	2,265	2,188	2,168	2,186	2,012	2,086	2,207	2,254
1:27	2,245	2,215	2,174	2,043	1,814	1,811	1,982	1,907
1:81	1,859	1,856	1,717	1,609	1,438	1,410	1,534	1,640
1:243	1,494	1,511	1,221	1,136	0,933	0,899	1,070	1,108
1:729	0,818	0,922	0,644	0,610	0,451	0,414	0,567	0,548
0	0,048	0,048	0,048	0,047	0,047	0,045	0,049	0,050
Вторичное антитело: Козий анти-человеческий IgG, HRP(1:5000)								
EC50 (нМ)	0,105		0,12		0,189		0,154	

3.2) Активность связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном PD-1 определяли с помощью непрямого ИФА. (Согласно методам, описанным в пункте 2.1 данного примера).

Результаты связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном PD-1 были показаны на фиг. 33. Очевидно, что антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003, и BiAb004 могут эффективно

связываться с белком PD-1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 7. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения EC50 антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с PD-1, затем определяли, как показано в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Активность связывания биспецифических антител с антигеном CTLA4 (непрямой ИФА)

Серийное разбавление антитела	Покрывающий антиген: PD-1-mFc 0,5 мкг/мл							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6 мкг/мл	2,400	2,360	2,370	2,314	2,332	2,290	2,347	2,343
1:3	2,450	2,426	2,290	2,388	2,271	2,326	2,410	2,458
1:9	2,402	2,457	2,372	2,346	2,279	2,351	2,390	2,505
1:27	2,409	2,467	2,332	2,348	2,350	2,243	2,414	2,396
1:81	2,375	2,254	2,084	1,990	1,996	1,928	2,197	2,175
1:243	1,871	1,725	1,627	1,544	1,414	1,419	1,573	1,560
1:729	1,067	1,047	0,954	0,814	0,746	0,719	0,920	0,865
0	0,085	0,067	0,065	0,068	0,055	0,055	0,056	0,058
Вторичное антитело: Козий анти-человеческий IgG, HRP (1:5000)								

3.3) Активность связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с CTLA4, соответственно, посредством конкурентного ИФА против B7/1-hFc (см. способы, описанные в п.1.2 данного примера).

Результаты связывания показаны на фиг. 34. Как показано на фигуре, антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно связывать антиген CTLA4 и ингибировать связывание CTLA4 с B7/1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 9. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения EC50 антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 затем определяли, как показано в табл. 9 ниже.

Таблица 9. Активность связывания антител с CTLA4 посредством конкурентного ИФА против B7/1-hFc

Серийное разбавление антитела	Покрывающий антиген: B7/1-hFc 0,5 мкг/мл							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3 мкг/мл	0,076	0,072	0,078	0,095	0,074	0,080	0,095	0,076
1:3	0,081	0,076	0,079	0,079	0,095	0,086	0,097	0,100
1:9	0,748	0,706	1,040	1,031	1,029	1,049	0,907	0,973
1:27	1,153	1,129	1,076	1,152	1,125	1,361	1,010	1,056
1:81	1,121	1,241	1,153	1,315	1,241	1,198	1,121	1,206
1:243	1,261	1,236	1,047	1,266	1,333	1,335	1,231	1,235
1:729	1,063	1,077	1,085	1,337	1,210	1,323	1,157	1,287
0	1,047	0,980		1,076				
	6	8	0,9131	2	1,067	1,074	1,032	0,966
Рецептор: CTLA4-mFc 0,3 мкг/мл								
Вторичное антитело: козий анти-мышинный IgG, HRP-конъюгат (1:5000)								
EC50 (нМ)	2,758		1,797		2,197		2,256	

3.4) Активность связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с антигеном PD-1 посредством конкурентного ИФА против PDL1 (см. способы, описанные в пункте 2.2 данного примера).

Результаты связывания показаны на фиг. 35. Очевидно, что антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно связывать антиген PD-1 и ингибировать связывание PD-1 с PDL1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 10. С помощью моделиро-

вания кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения EC50 антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с CTLA4, затем определяли, как показано в табл. 10 ниже.

Таблица 10. Активность связывания антител с PD-1 посредством конкурентного ИФА против PDL1

Концентрация антитела	Покрывающий антиген: PD-1-hFc 0,5 мкг/мл							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3 мкг/мл	0,347	0,348	0,369	0,353	0,074	0,075	0,078	0,075
1:3	0,314	0,326	0,348	0,350	0,071	0,081	0,073	0,074
1:9	0,332	0,330	0,340	0,340	0,095	0,095	0,093	0,095
1:27	0,542	0,775	0,758	0,733	0,695	0,737	0,639	0,643
1:81	1,041	1,009	1,018	1,063	0,983	1,010	0,954	1,019
1:243	1,131	1,117	1,149	1,186	1,070	1,165	1,009	1,082
1:729	1,186	1,129	1,072	1,199	1,093	1,029	1,032	1,080
0	1,2345	1,1091	1,1243	1,1759	1,101	1,140	1,178	1,153
Рецептор: PDL1-mFc 0,3 мкг/мл								
Вторичное антитело : козий анти-человеческий IgG, HRP (1:5000)								
EC ₅₀ (нМ)	0,685		0,543		0,665		0,62	

Пример 10. Активность связывания антител с антигеном клеточной поверхности методом проточной цитометрии.

Были сконструированы клетки-хозяева 293Т, экспрессирующие антигены CTLA4 или PD-1, соответственно, и помечены гуманизированными антителами, полученными согласно данному изобретению. Способность антител специфически связываться с соответствующими антигенами клеточной поверхности в их нативной конформации была проанализирована и подтверждена с помощью проточной цитометрии.

1) Конструирование клетки-хозяина 293Т, экспрессирующей CTLA4 или PD-1.

Клетки 293Т трансфицировали плазмидой pLenti6.3-CTLA4, содержащей CTLA4, или плазмидой pLenti6.3-PD-1, содержащей PD-1 (вектор pLenti6.3 был приобретен у Invitrogen Corporation), и подвергали скринингу для получения стабильных пулов 293Т-CTLA4 или 293Т-PD-1, экспрессирующих CTLA4 или PD-1, соответственно.

2) Связывание антител с антигенами клеточной поверхности. Полученные выше клетки-хозяева, которые экспрессируют отдельный антиген, расщепляли с использованием трипсина и распределяли в пробирки, каждая из которых содержала 2×10^5 клеток. Антитела разбавляли в градиенте с использованием буфера PBSA (1% БСА) и инкубировали с клетками 293Т, которые экспрессируют соответствующие антигены, на льду в течение 2 часов. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC-меченого козьего античеловеческого IgG (1:500) и инкубировали на льду в течение 1 часа. После 3-кратной промывки с помощью PBS клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS и измеряли сигналы флуоресценции на проточном цитометре с использованием канала FITC.

2.1) Активность связывания антител с антигенами клеточной поверхности.

Результаты связывания гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с клетками 293Т-CTLA4 показаны на фиг. 36 и 37. Как показано на фигуре, антитела 4G10H1L1 и 4G10H3L3 могут эффективно связываться с целевым белком CTLA4, экспрессируемым на поверхности клеток-хозяев 293Т-CTLA4 с зависимостью от дозы. Интенсивности флуоресценции при разных дозах показаны в табл. 11. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения было определено, что EC₅₀ связывания 4G10H1L1 и 4G10H3L3 с CTLA4 составляет 7,58 и 10,54 нМ, соответственно.

Таблица 11. Интенсивности флуоресценции антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3, связывающихся с CTLA4, экспрессированным на поверхности клеток 293T-CTLA4, с помощью проточной цитометрии

	4G10H1L1	4G10H2L2
Концентрация антитела (нМ)	интенсивность флуоресценции	
0,01	14,93	15,13
0,1	24,79	47,05
1	106,77	97,27
2,5	272,24	236,66
5	547,76	465,54
10	1080,91	788
20	1568,19	1296,95
50	1652,26	1539,24

2.2) Результаты связывания гуманизированного антитела 14C12H1L1 с клетками 293T-PD-1 показаны на фиг. 38. Как показано на фигуре, антитело 14C12H1L1 может эффективно связываться с целевым белком PD-1, экспрессируемым на поверхности клеток-хозяев 293T-PD-1, с зависимостью от дозы. Интенсивности флуоресценции при разных дозах показаны в табл. 12. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа интенсивности флуоресценции было установлено, что EC_{50} связывания 14C12H1L1 с PD-1 составляет 1,89 нМ.

Таблица 12. Интенсивность флуоресценции антитела 14C12H1L1, связывающегося с PD-1, экспрессированного на поверхности клеток 293T-PD-1, с помощью проточной цитометрии

Концентрация антитела (нМ)	0,01	0,1	1	5	10	50
интенсивность флуоресценции	8,32	20,31	174,62	579,41	686,49	669,54

2.3) Результаты связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с клетками 293T-CTLA4 были показаны на фиг. 39-42. Как показано на фигурах, антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно связываться с целевым белком CTLA4, экспрессируемым на поверхности клеток-хозяев 293T-CTLA4, с зависимостью от дозы. Интенсивности флуоресценции при разных дозах показаны в табл. 13. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа интенсивностей флуоресценции определяли EC_{50} BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, как показано в табл. 13 ниже.

Таблица 13. Интенсивности флуоресценции и EC_{50} антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с CTLA4, экспрессируемым на клеточной поверхности 293T-CTLA4, с помощью проточной цитометрии

Концентрация антитела (нМ)	BiAb001	BiAb002	BiAb003	BiAb004
	MFI (интенсивность флуоресценции)			
0,0	–	–	12,9	13,0
0,1	10,5	10,5	14,2	15,6
1,0	21,2	20,4	28,7	34,8
2,5	46,8	43,8	49,6	77,4
5,0	92,9	93,5	101,0	129,6
10,0	181,9	171,2	245,3	313,0
20,0	312,8	282,1	487,4	608,6
50,0	469,5	466,5	899,8	1260,8
100,0	423,0	435,3	937,5	1020,6
200,0	381,6	408,2	–	–
EC_{50} (нМ)	11,9	13,7	19,9	17,8

2.4) Результаты связывания антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 с клетками 293T-PD-1 показаны на фиг. 43-46. Очевидно, что антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффектив-

но связываться с PD-1, экспрессируемым на поверхности клетки-хозяина 293T-PD-1, с зависимостью от дозы. Интенсивности флуоресценции при разных дозах показаны в табл. 14. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения значения EC_{50} для BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 были определены, как показано в табл. 14 ниже.

Таблица 14. Интенсивности флуоресценции антител BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с PD-1, экспрессированным на поверхности клеток 293T-PD-1, с помощью проточной цитометрии

	BiAb001	BiAb002		BiAb003	BiAb004
Концентрация антител/нМ	MFI (интенсивность флуоресценции)		Концентрация антител/нМ	MFI (интенсивность флуоресценции)	
0,01	10,18	11	0,01	8,56	8,89
0,08	13,92	14,09	0,1	14,57	13,46
0,75	36,44	36,11	1	70,76	50,8
1,88	74,27	70,97	2,5	143,24	100,83
3,75	148,28	142,37	5	332,5	204,83
7,5	223,29	204,22	10	632,57	378,31
15	337,03	302,05	20	1026,03	535,69
37,5	358,78	290,92	50	958,92	734,73
			100	943,77	682,25
EC_{50} (нМ)	5,69	4,61		7,18	10

3) Активность связывания антител с поверхностными антигенами CTLA4 и PD-1 Т-клеток РВМС выделяли с помощью Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT № 171440-02) и дополнительно выделяли для получения CD4+ клеток, а затем клетки стимулировали РНА в течение трех суток, после чего клетки один раз промывали PBS и смешивали с антителами в различных концентрациях, а затем инкубировали на льду в течение 1,5 часов. Затем клетки промывали PBS один раз после инкубации, и FITC-меченный анти-человеческий IgG (Jackson immunoresearch lot. 102155). Затем клетки инкубировали на льду в темноте в течение 1 часа, один раз промывали PBS, а затем измеряли сигналы флуоресценции на проточном цитометре.

Контрольное антитело против PD-1 ниволумаб является коммерчески доступным, и его информацию также можно найти в <http://www.drugbank.ca/drugs/DB09035>.

Контрольное антитело против CTLA4 ипилимумаб является коммерчески доступным, и его информацию можно найти в <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06186>.

3.1) Результаты связывания гуманизированного антитела 4G10H3L3 с Т-клетками показаны на фиг. 47. Как показано на фигуре, антитело 4G10H3L3 может эффективно связываться с целевым белком CTLA4, экспрессируемым на поверхности Т-клеток, с зависимостью от дозы.

3.2) Результаты связывания гуманизированного антитела 14C12H1L1 с Т-клетками показаны на фиг. 48. Как показано на фигуре, антитело 14C12H1L1 может эффективно связываться с целевым PD-1, экспрессируемым на поверхности Т-клеток, с зависимостью от дозы.

3.3) Активность связывания с Т-клетками антител BiAb003 и BiAb004 по сравнению с активностью 14C12H1L1 и 4G10H3L3 показана на фиг. 49. Как показано на фигуре, антитела BiAb003, BiAb004, 14C12H1L1 и 4G10H3L3 могут эффективно связываться с целевым белком PD-1, экспрессируемым на поверхности Т-клеток, с зависимостью от дозы. Кроме того, активность связывания антител BiAb003, BiAb004 и 14C12H1L1 с Т-клетками была сильнее, чем у антител 4G10H3L3, ниволумаба и ипилимумаба. Интенсивность флуоресценции показана в табл. 15.

Таблица 15. Интенсивности флуоресценции антител 14C12H1L1, 4G10H3L3, BiAb003 и BiAb004, связывающихся с Т-клетками

Концентрация антител/нМ	100	10	1
Название антитела	MFI (интенсивность флуоресценции)		
PBS	8,39	–	–
hIgG	10,15	–	–
ниволумаб	22,88	–	–
ипилилумаб	8,35	–	–
14C12H1L1	48,94	29,93	19,97
4G10H3L3	14,11	9,78	8,62
BiAb003	49,09	23,67	14,65
BiAb004	47,54	22,85	14,66

Пример 11. Смешанная лимфоцитарная реакция: секреция цитокинов ИФН-γ и ИЛ-2.

PBMC были выделены при помощи Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, партия № 171440-02), затем смешивали с ИЛ-4 (Peprotech K2513, 1000 ед./мл) и GM-CSF (Peprotech H1513, 1000 ед./мл) для индукции в течение 6 суток, а затем добавляли ФНО-α (Peprotech G1513, 200 ед./мл) для индукции в течение 3 суток для получения клеток DC.

Т-клетки выделяли из PBMC и смешивали с клетками DC, полученными выше, в соотношении 1:10 к культуре вместе с каждым антителом (hIgG wa в качестве контроля) в различных соотношениях в течение 5-6 суток. Секрецию ИФН-γ или ИЛ-2 измеряли с помощью наборов реагентов для ИФА (оба были приобретены у Dakewe), соответственно.

Секреция ИФН-γ после смешанной культуры клеток DC и Т-клеток показана на фиг. 50-53. Секреция ИЛ-2 после смешанной культуры клеток DC и Т-клеток показана на фиг. 54-56.

Как показано на фигурах, антитела 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 14C12H1L1, а также биспецифические антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно индуцировать секрецию ИФН-γ и ИЛ-2 в смешанных лимфоцитах. Секреция ИФН-γ, индуцированная 1 нМ или 10 нМ антителом 14C12H1L1 против PD-1, была сравнима с таковой 100 нМ контрольного антитела ниволумаба. Секреция ИФН-γ, индуцированная 100 нМ антителами 4G10H1L1 и 4G10H3L3 против CTLA4, была лучше, чем секреция 100 нМ контрольного антитела ипилимумаб (фиг. 52).

Пример 12. Индуцированная секреция ИЛ-2.

Выделенные PBMC (такой же метод, как в примере) стимулировали PHA (Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 мкл/мл) в течение 3 суток, а затем смешивали PBMC (от добровольных доноров крови, 5×10^4 клеток/лунка) с клетками Raji (от ATCC, 5×10^4 клеток/лунка) и клетками MDA-MB-231 (от ATCC, 1×10^4 клеток/лунка) в 96-луночной планшете. Антитела (100 нМ) добавляли, смешивали и культивировали вместе. После совместного культивирования в течение 3 суток секрецию ИЛ-2 измеряли с помощью набора реагентов для ИФА (приобретенного у Dakewe) в соответствии с инструкциями.

Секреция ИЛ-2 после смешанной клеточной культуры показана на фиг. 57, фиг. 58 и 59, соответственно. Как показано на фигурах, антитела 4G10H1L1, 4G10H3L3 и 14C12H1L1, а также биспецифические антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 могут эффективно индуцировать секрецию ИЛ-2 PBMC. Антитело 14C12H1L1 против PD-1 может индуцировать более высокую секрецию ИЛ-2, чем контрольное антитело ниволумаб (фиг. 58), а биспецифические антитела BiAb001, BiAb002, BiAb003 и BiAb004 оказывают такие же эффекты на секрецию ИЛ-2, что и 14C12H1L1+4G10H1L1 или 14C12H1L1+4G10H3L3 (фиг. 59).

Пример 13. Влияние антитела BiAb004 на рост опухоли в модели опухоли MC38 у мышей PD-1 HuGEMM.

Опухолевые клетки MC38 инокулировали подкожно в правый бок мышей PD-1 HuGEMM (1×10^6 клеток/мышь, трансгенных мышей с PD-1 человека). Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 144 мм^3 , мышей случайным образом делили на 4 экспериментальные группы относительно объема опухоли с 8 мышами в каждой группе. Антитела вводили через брюшную полость, специфическое группирование и дозы были следующими:

- группа изотипического контроля (доза: 2,67 мг/кг),
- группа с высокой дозой BiAb004 (доза: 2,67 мг/кг),
- группа с низкой дозой BiAb004 (доза: 0,267 мг/кг).

Вышеуказанным 3 группам вводили антитела два раза в неделю, всего 5 раз. После инъекции размеры опухолей измеряли два раза в неделю.

Результаты предоставлены на фиг. 60.

Очевидно.

Статистически размеры опухолей в группе с высокими дозами BiAb004 и в группе с низкими доза-

ми BiAb004 были значительно меньше, чем в группе изотипического контроля ($P < 0,001$, $P < 0,05$, соответственно). Группы с низкими дозами BiAb004 продемонстрировали статистически значимый противоопухолевый эффект на модели опухоли MC38 у мышей PD-1^{0/0} HuGEMM.

Хотя конкретные варианты осуществления данного изобретения были описаны подробно, как будет понятно специалисту в данной области техники, эти детали могут повлечь за собой различные модификации и замены в соответствии со всеми раскрытыми нами принципами. Все эти изменения охватываются объемом данного изобретения. Полный объем данного изобретения охватывается прилагаемой формулой изобретения и любыми эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере одну первую функциональную область белка, которая связывается с PD-1, и по меньшей мере одну вторую функциональную область белка, которая связывается с CTLA4, где по меньшей мере одна первая и по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одна первая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34, где по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35-37, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40.

2. Биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере одну первую функциональную область белка, которая связывается с PD-1, и по меньшей мере одну вторую функциональную область белка, которая связывается с CTLA4, где по меньшей мере одна первая и по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одна первая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34, где по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35, 41 и 37, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40.

3. Биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере одну первую функциональную область белка, которая связывается с PD-1, и по меньшей мере одну вторую функциональную область белка, которая связывается с CTLA4, где по меньшей мере одна первая и по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одна первая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 29-31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 32-34, где по меньшей мере одна вторая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 42-44, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 45-47.

4. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-3, где вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере одной функциональной области первого белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20, и вариабельная область легкой цепи по меньшей мере одной функциональной области первого белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 22.

5. Биспецифическое антитело по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, и вариабельная область легкой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12.

6. Биспецифическое антитело по п.2, где вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельная область легкой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

7. Биспецифическое антитело по п.3, где вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и вариабельная область легкой цепи по меньшей мере одной функциональной области второго белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где по меньшей мере одна первая функциональная область белка и по меньшей мере одна вторая функциональная область белка соединены непосредственно или соединены посредством соединительного фрагмента.

9. Биспецифическое антитело по п.8, где соединительный фрагмент представляет собой (GGGGS)_n, где *n* равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-9, где антигенсвязывающий фрагмент включает полуантитело, Fab, F(ab')₂ или одноцепочечное антитело.

11. Биспецифическое антитело по п.10, где по меньшей мере одна функциональная область первого белка содержит антитело и по меньшей мере одна функциональная область второго белка содержит одноцепочечное антитело.

12. Биспецифическое антитело по п.10, где по меньшей мере одна функциональная область первого белка содержит одноцепочечное антитело, и по меньшей мере одна функциональная область второго белка содержит антитело.

13. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-9, где антитело представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

14. Биспецифическое антитело по п.13, где антитело представляет собой IgG.

15. Биспецифическое антитело по п.14, где IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

16. Биспецифическое антитело по п.11 или 12, где одноцепочечное антитело присоединено к С-концу тяжелой цепи антитела.

17. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую часть биспецифического антитела по п.1, где нуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи антитела и одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 29-31, и где одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35-37 и переменную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую часть биспецифического антитела по п.2, где нуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи антитела и одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 29-31, и где одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35, 41 и 37, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 38-40.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую часть биспецифического антитела по п.3, где нуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи антитела и одноцепочечное антитело, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 29-31, и где одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 42-44, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 45-47.

20. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по пп.17-19 или любую их комбинацию.

21. Линия клеток-хозяев, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по пп.17-19 или любую их комбинацию, или вектор экспрессии по п.20.

22. Конъюгат, содержащий биспецифическое антитело по любому из пп.1-16 и партнер конъюгации в качестве маркера детекции.

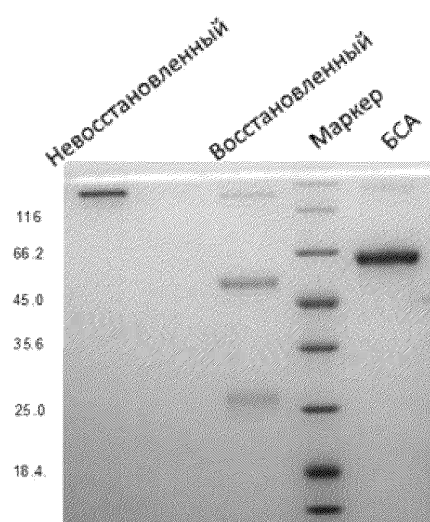
23. Конъюгат по п.22, где партнером конъюгации является радиоактивный изотоп, флуоресцеин, люминесцентное вещество, краситель или фермент.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело любого из пп.1-16, или конъюгат по п.22, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

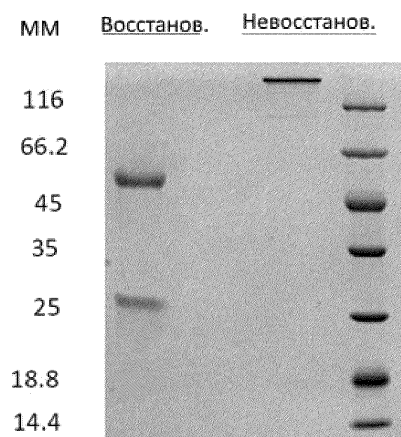
25. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-16, конъюгата по п.22 или фармацевтической композиции по п.24 в способе лечения или адъювантного лечения опухолей.

26. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-16, конъюгата по п.22 или фармацевтической композиции по п.24 для диагностики опухолей.

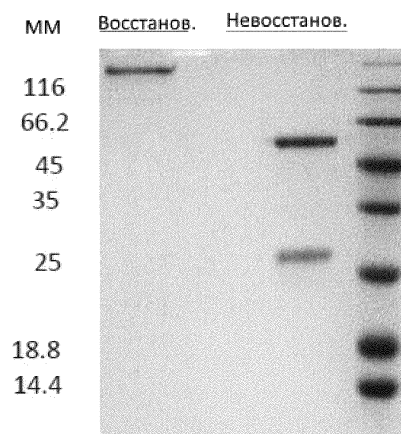
27. Применение по п.25 или 26, где опухоль представляет собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников или лейкоз.



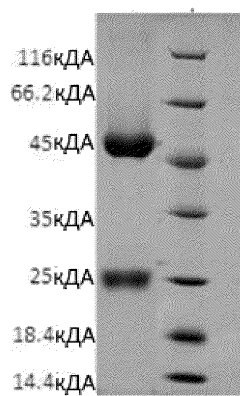
Фиг. 1



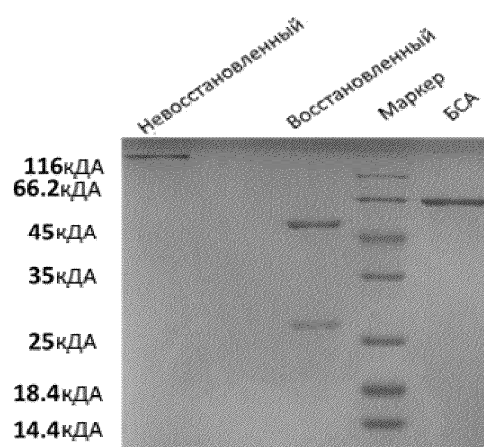
Фиг. 2



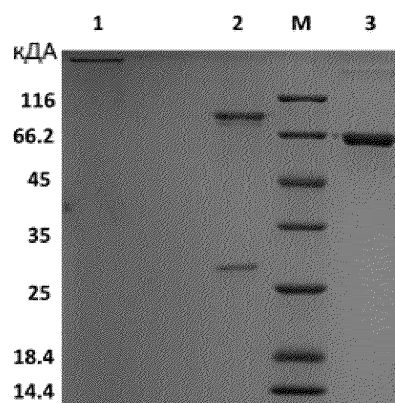
Фиг. 3



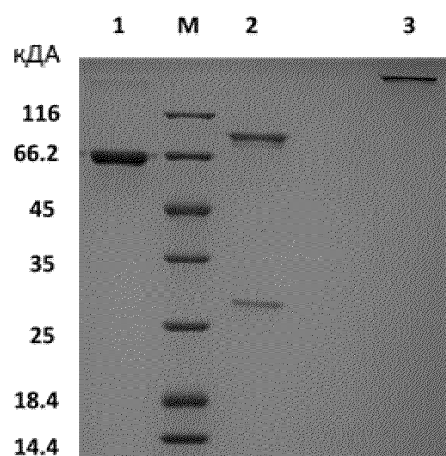
Фиг. 4



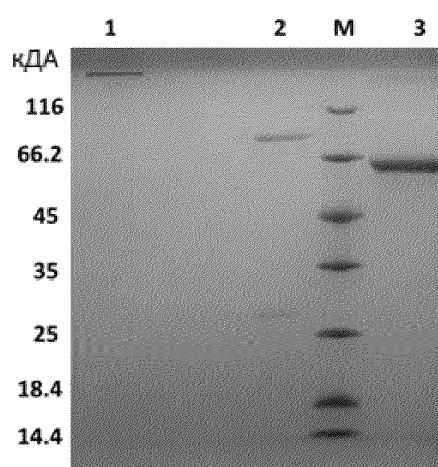
Фиг. 5



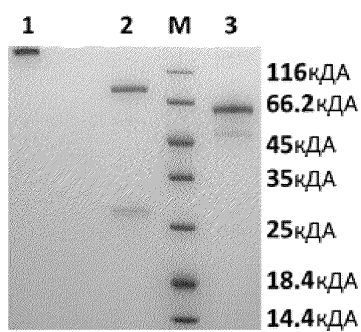
Фиг. 6



Фиг. 7

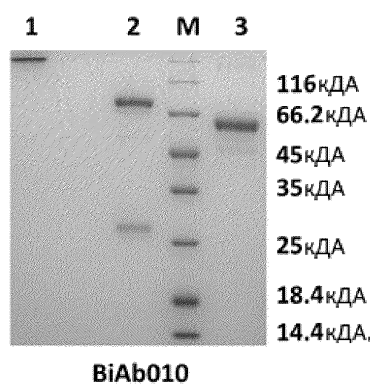


Фиг. 8

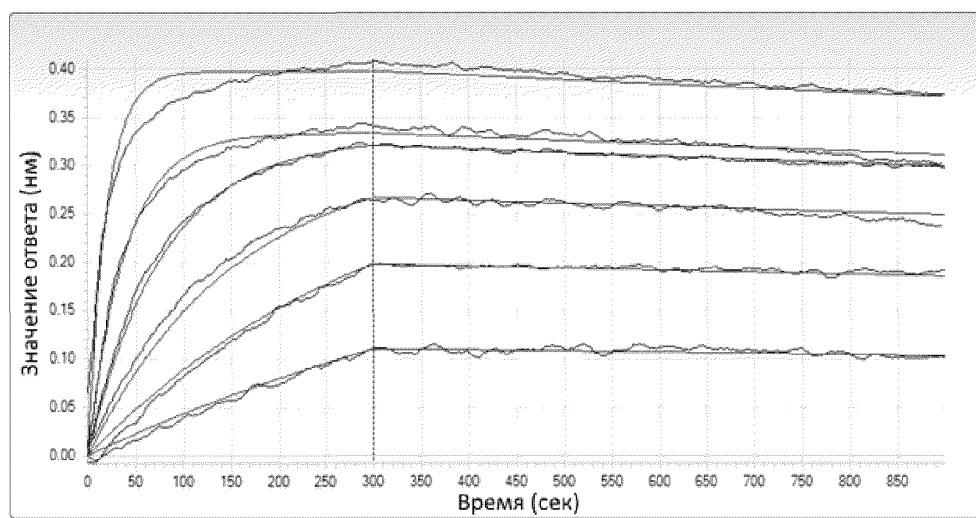


BiAb007

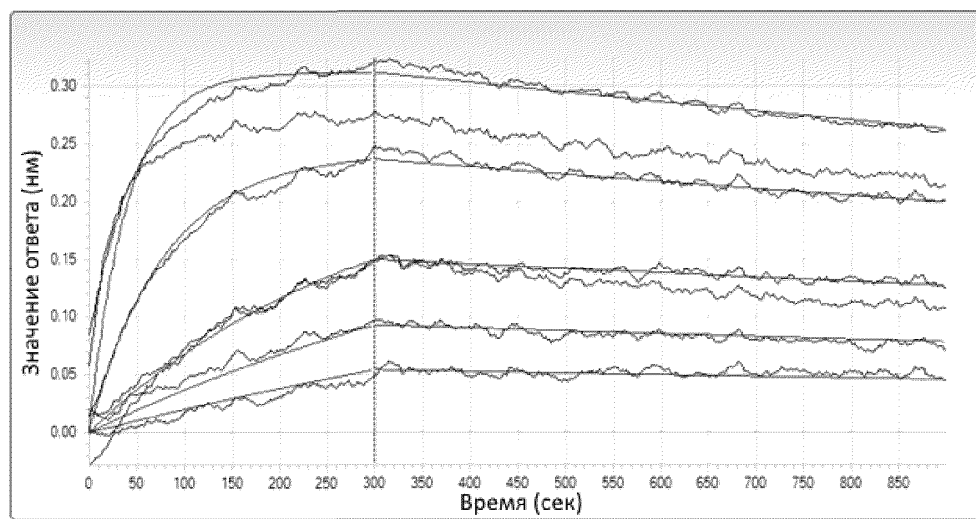
Фиг. 9



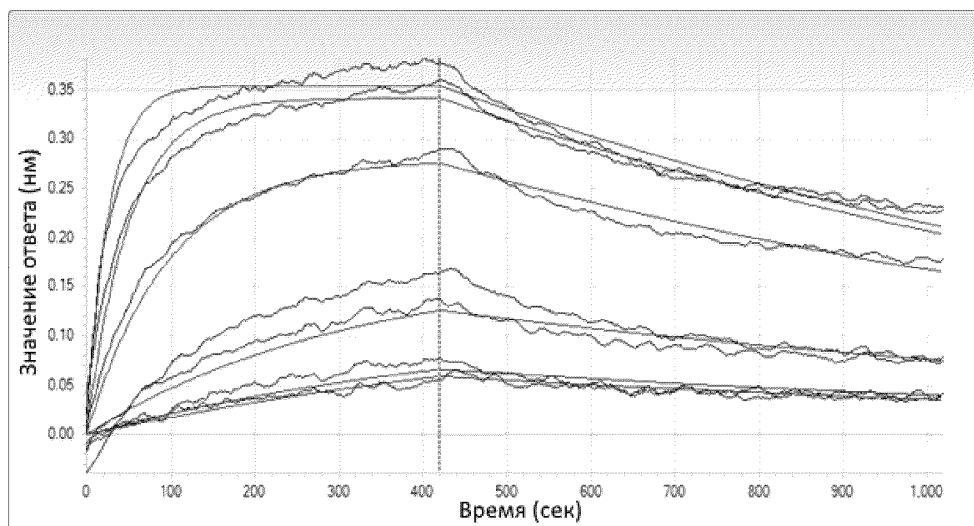
Фиг. 10



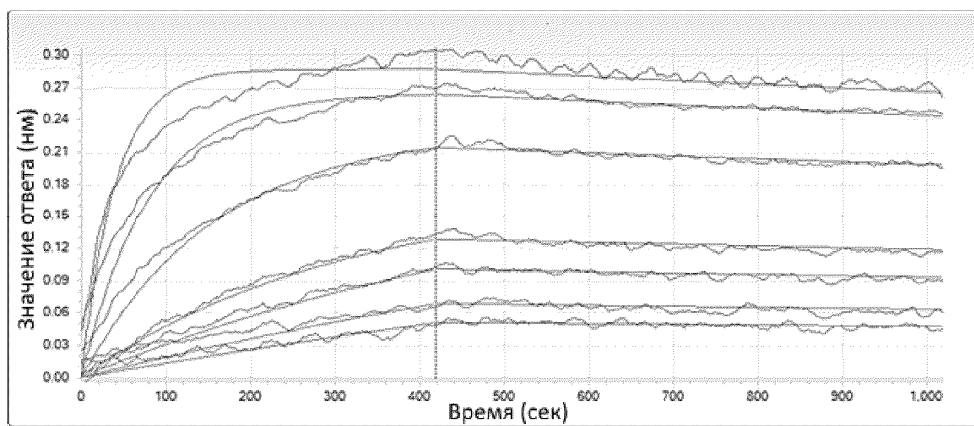
Фиг. 11



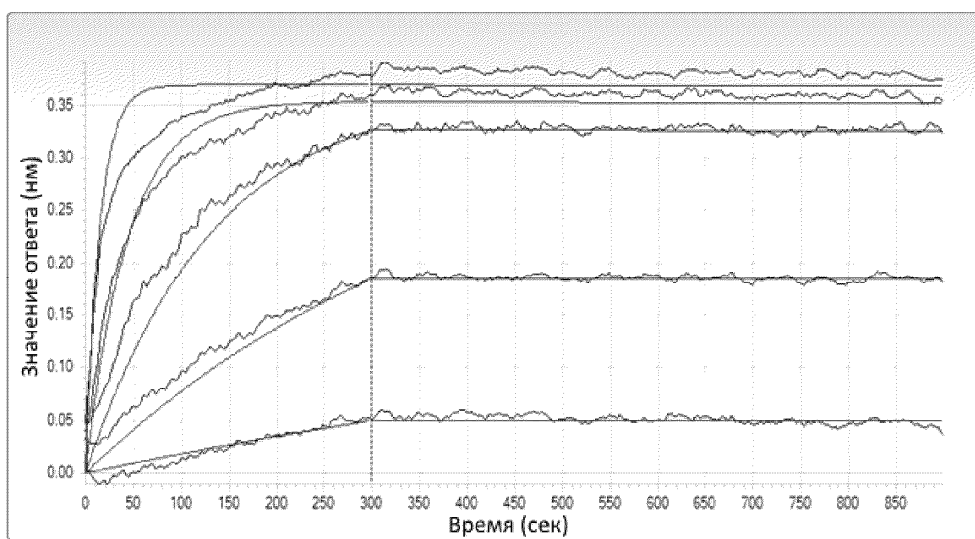
Фиг. 12



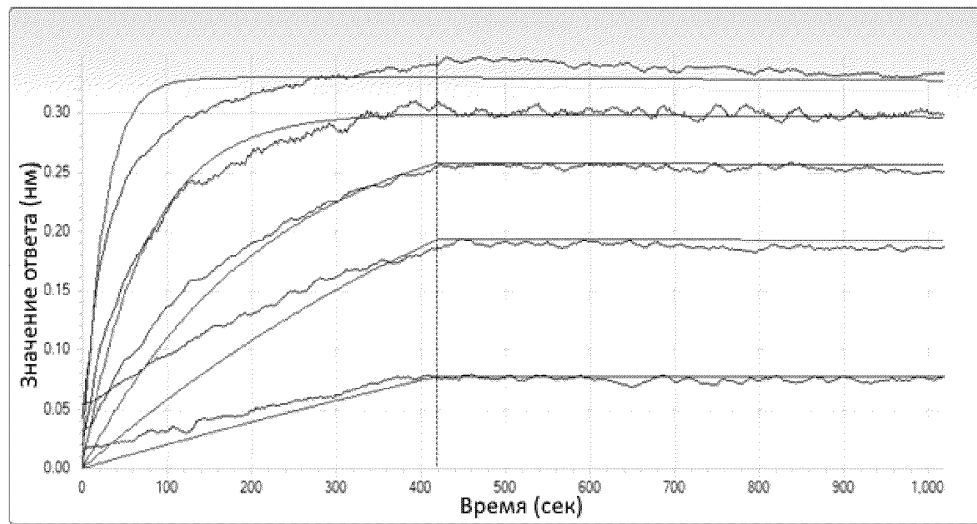
Фиг. 13



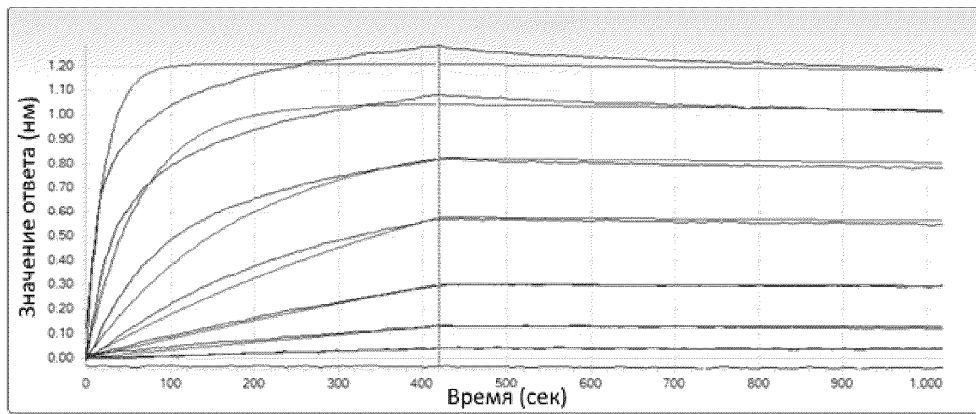
Фиг. 14



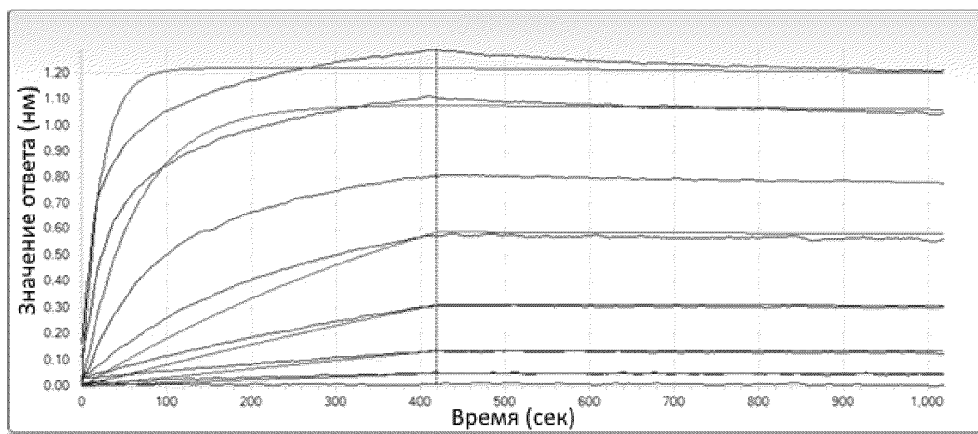
Фиг. 15



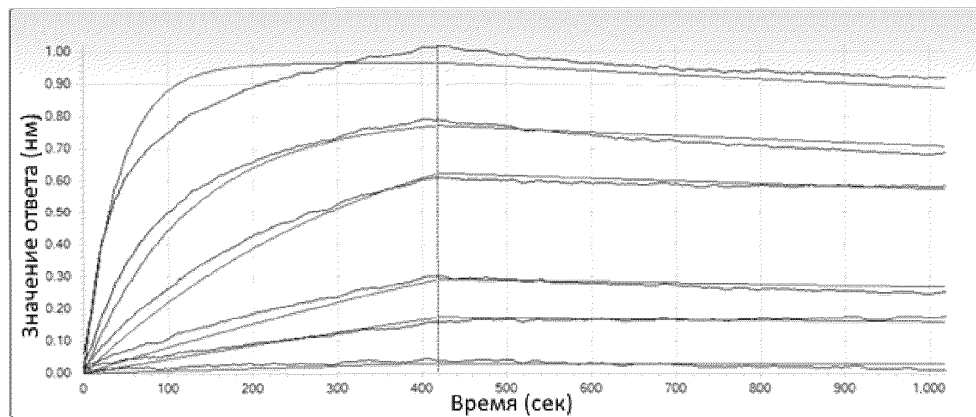
Фиг. 16



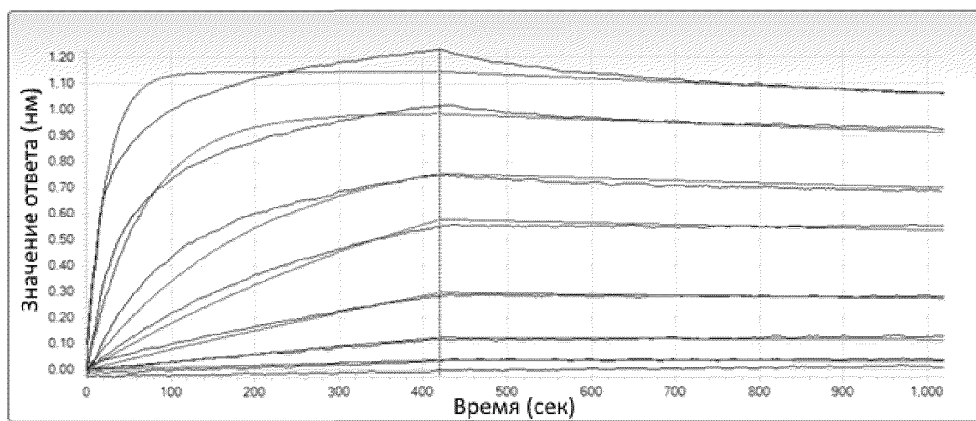
Фиг. 17



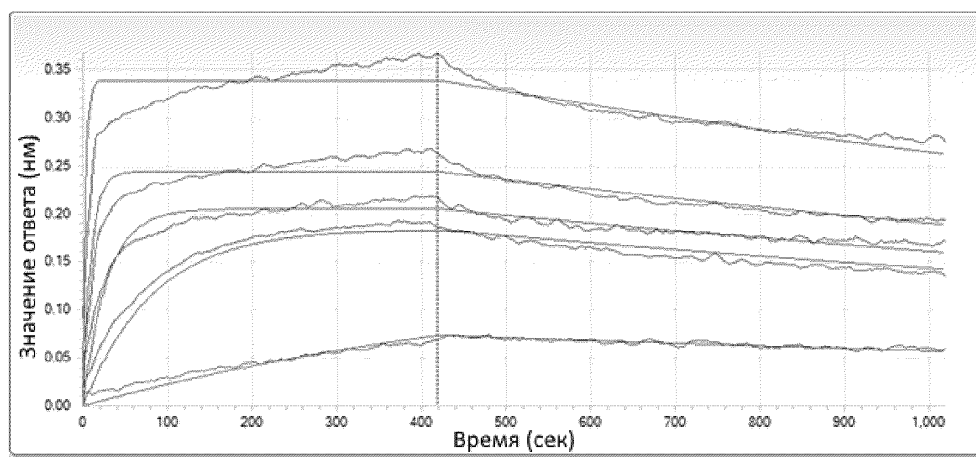
Фиг. 18



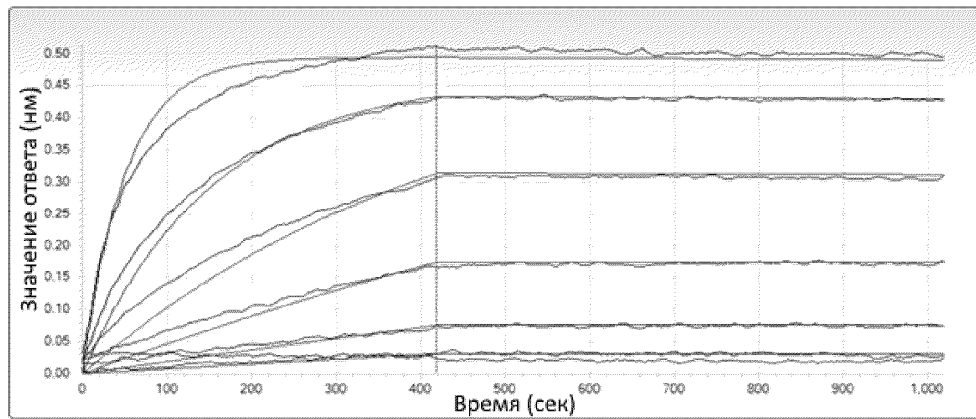
Фиг. 19



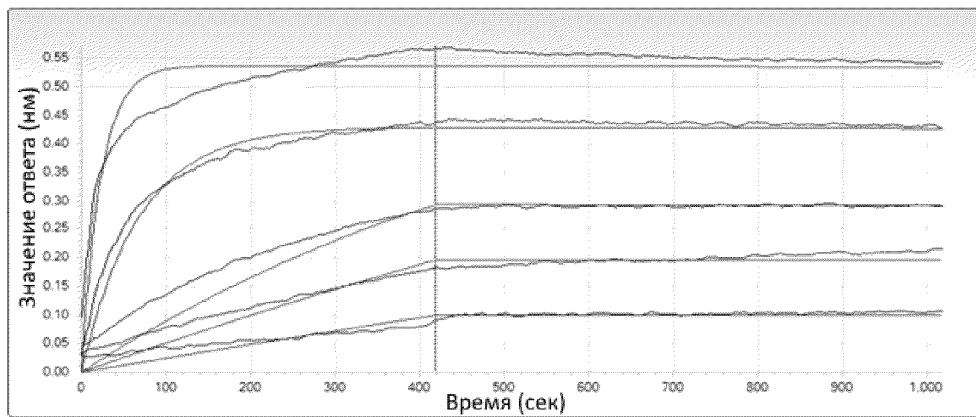
Фиг. 20



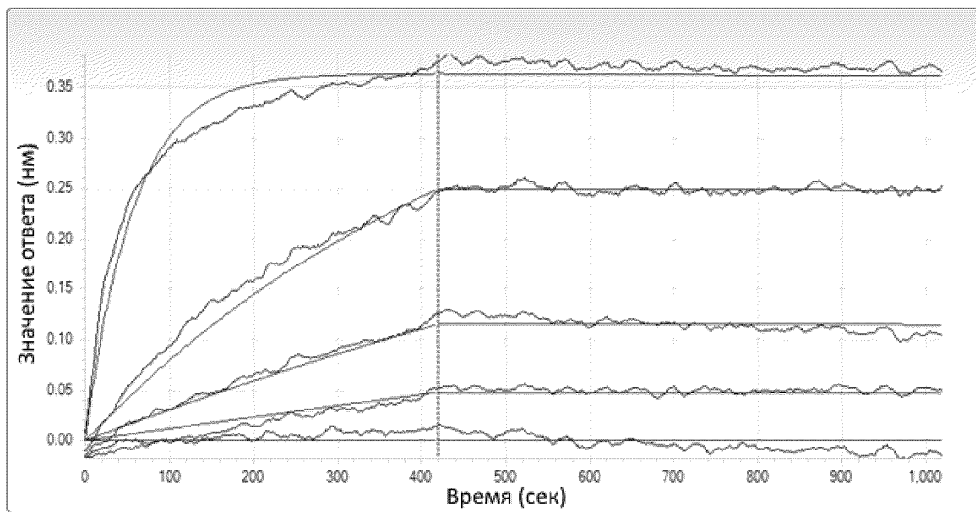
Фиг. 21



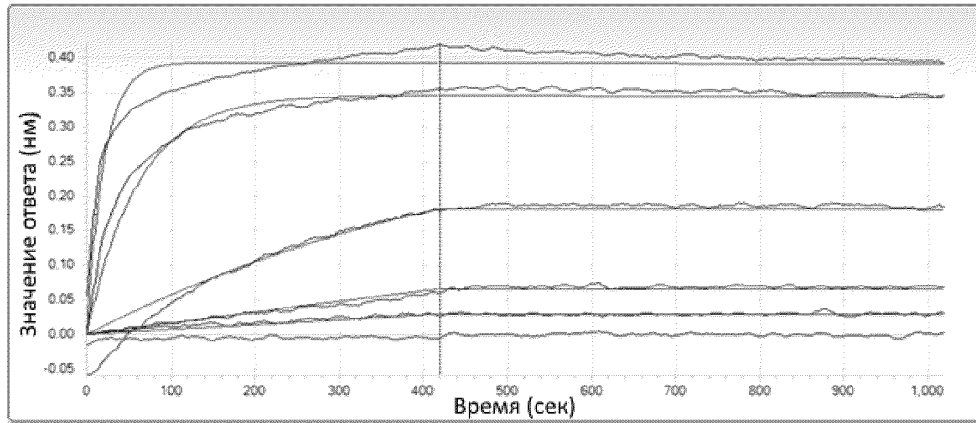
Фиг. 22



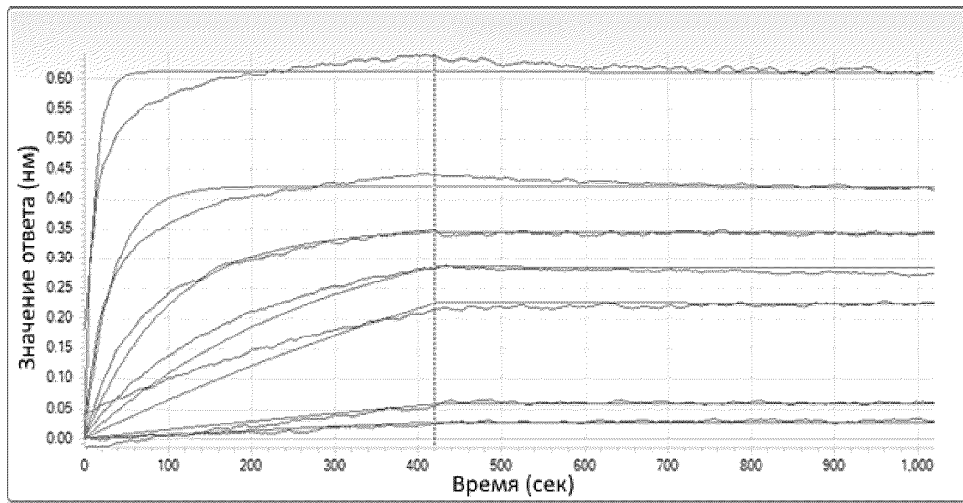
Фиг. 23



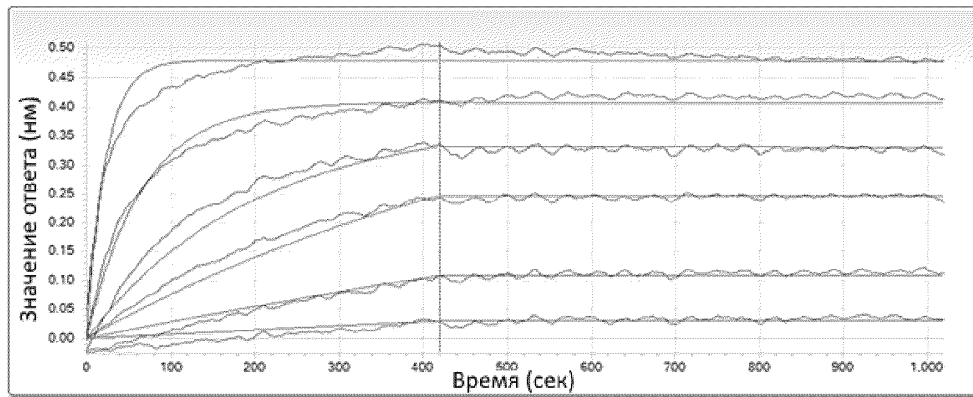
Фиг. 24



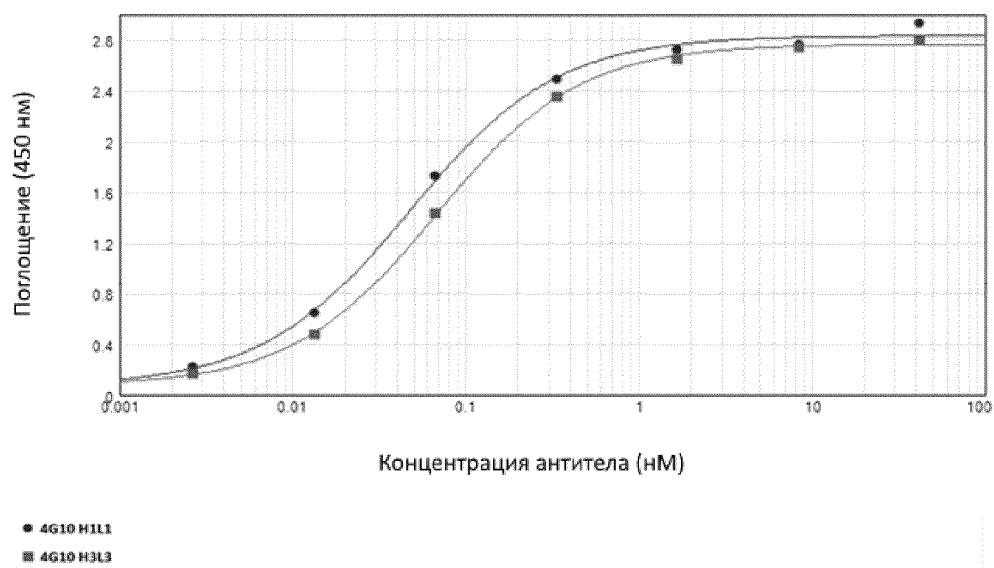
Фиг. 25



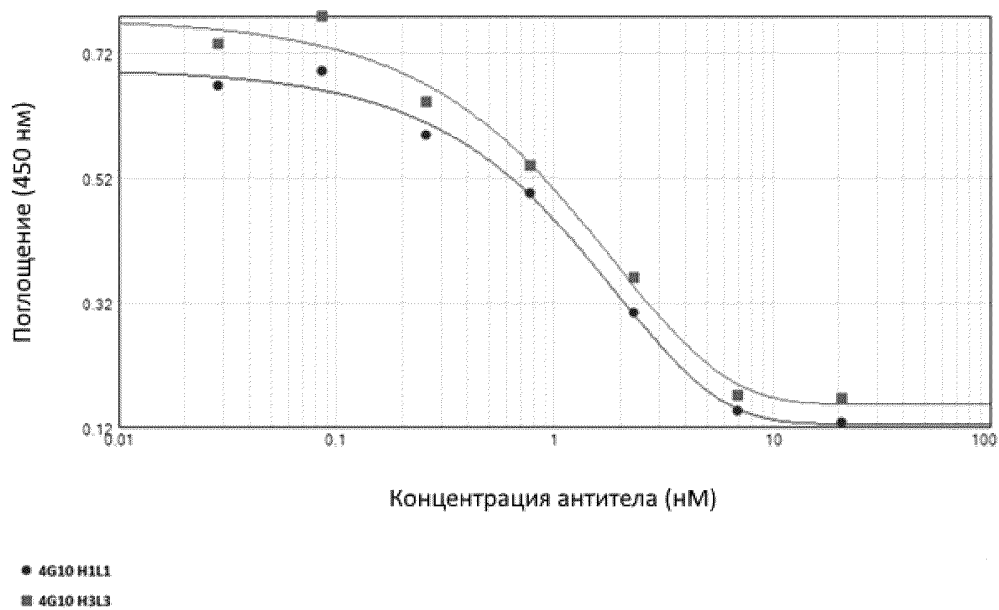
Фиг. 26



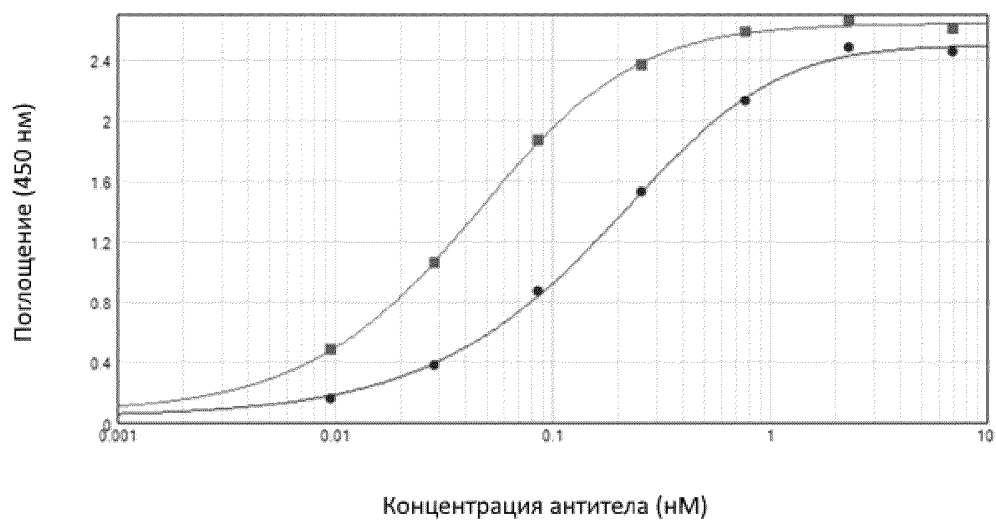
Фиг. 27



Фиг. 28

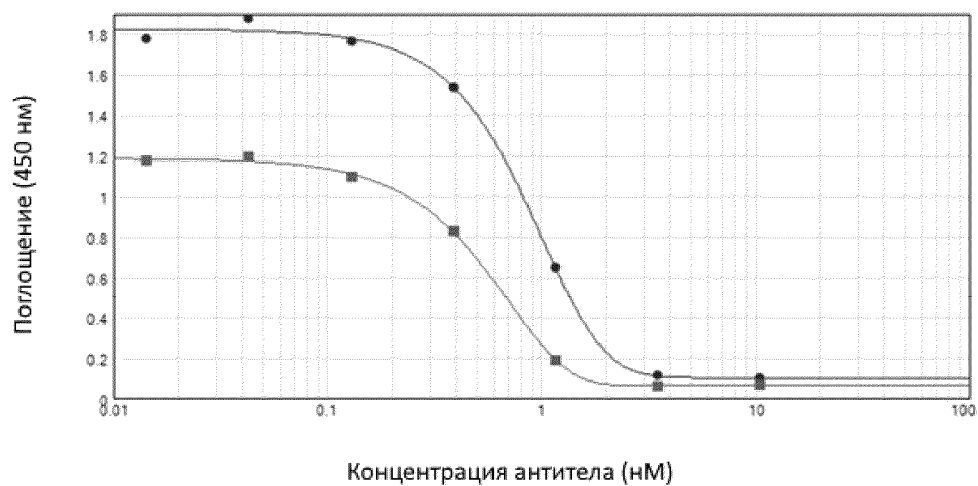


Фиг. 29



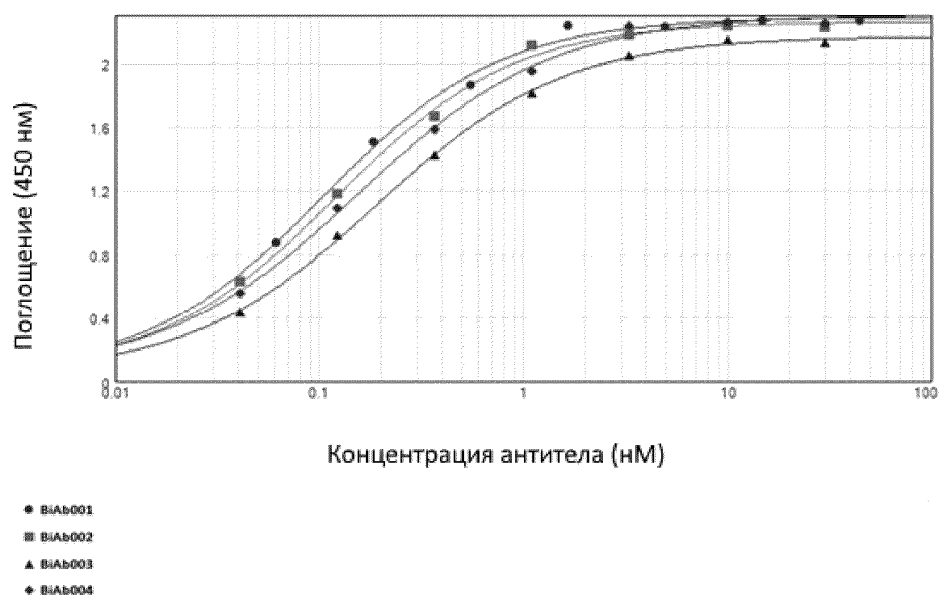
● 14C12
■ 14C12 H1L1

Фиг. 30

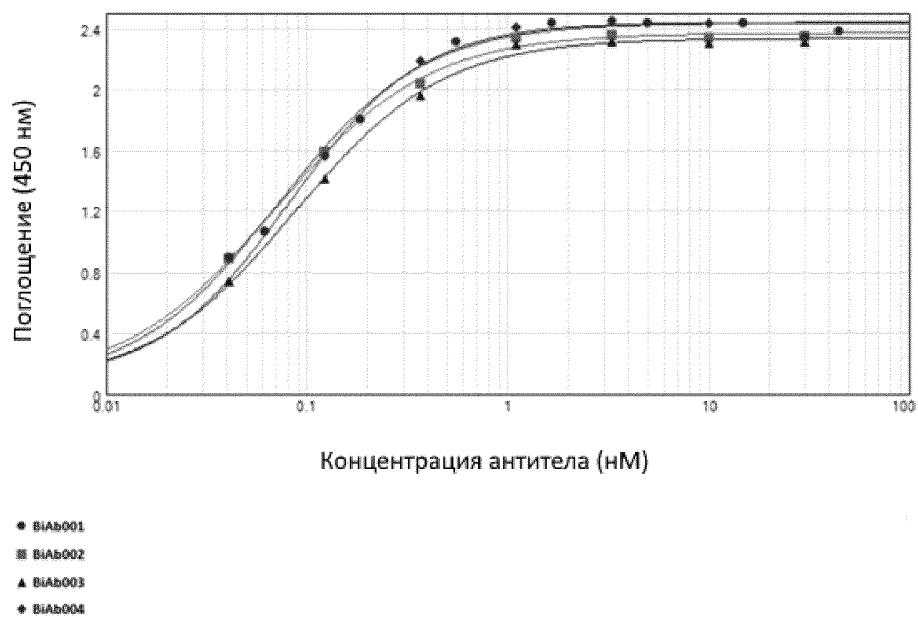


● 14C12
■ 14C12 H1L1

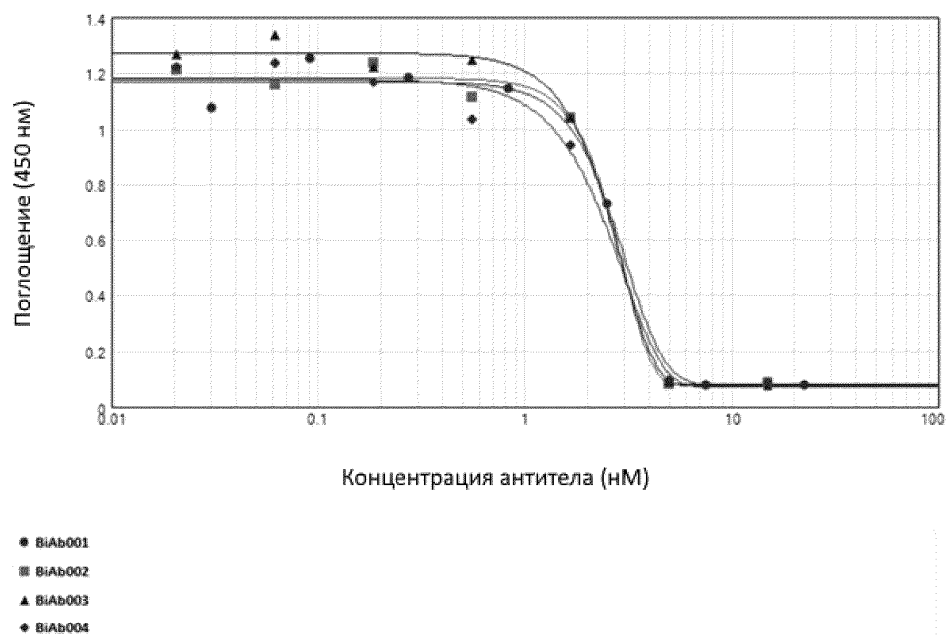
Фиг. 31



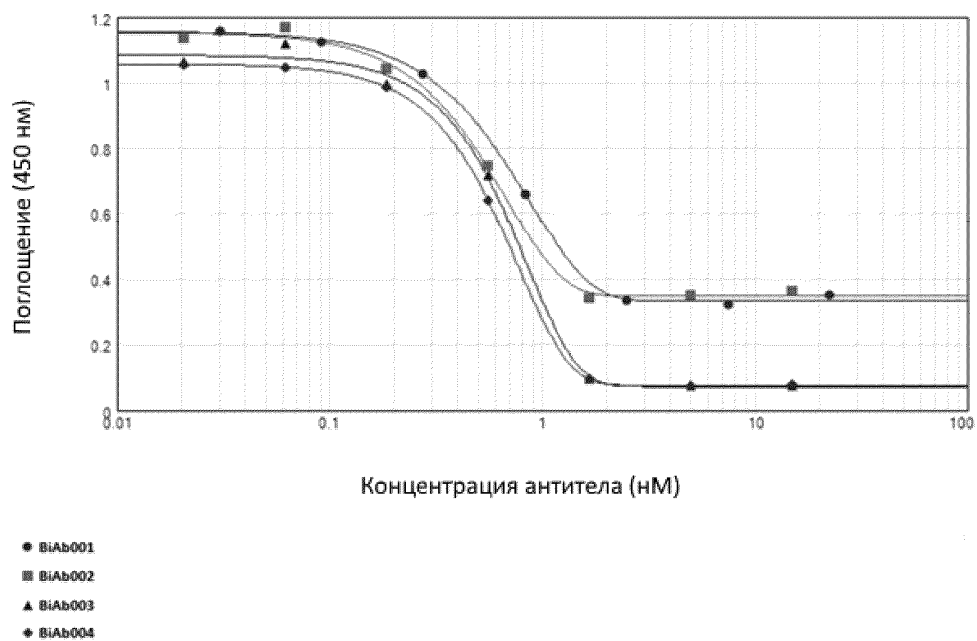
Фиг. 32



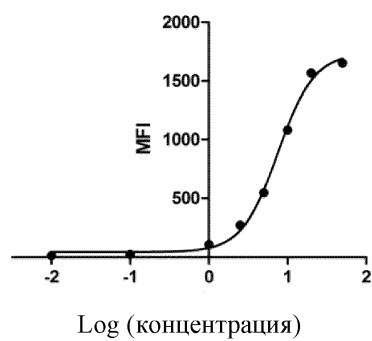
Фиг. 33



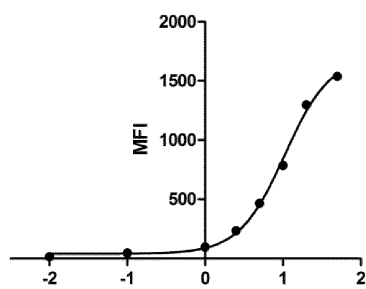
Фиг. 34



Фиг. 35

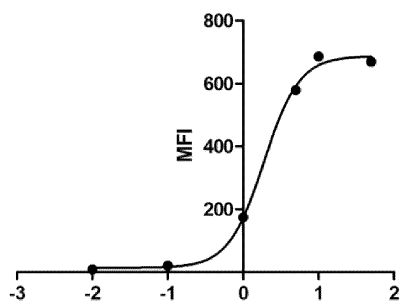


Фиг. 36



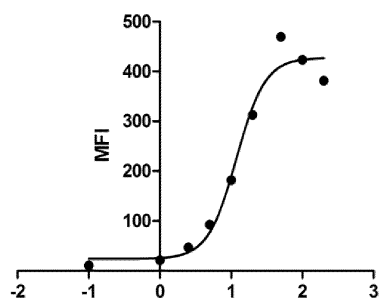
Log (концентрация)

Фиг. 37



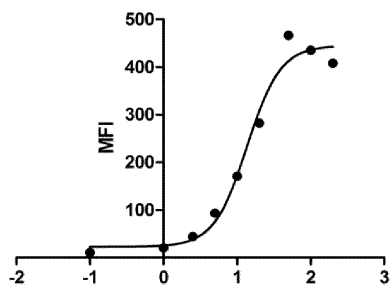
Log (концентрация)

Фиг. 38



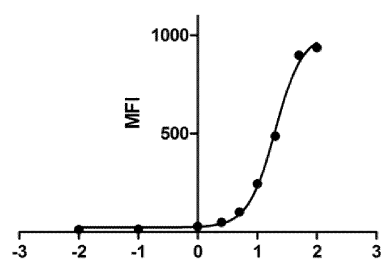
Log (концентрация)

Фиг. 39



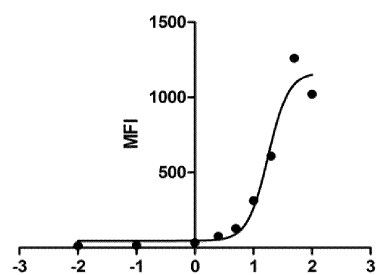
Log (концентрация)

Фиг. 40



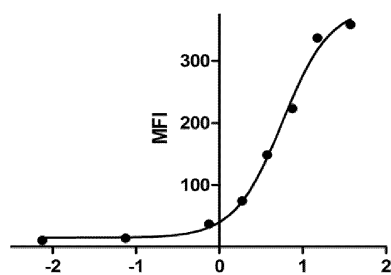
Log (концентрация)

Фиг. 41



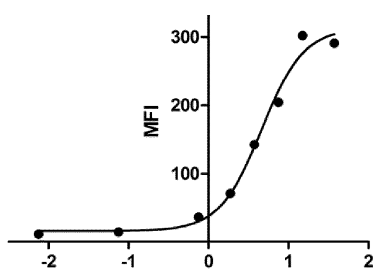
Log (концентрация)

Фиг. 42



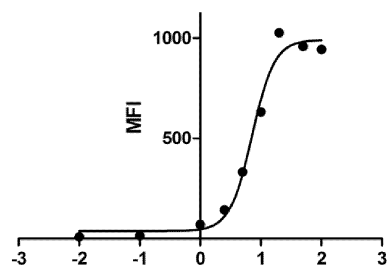
Log (концентрация)

Фиг. 43



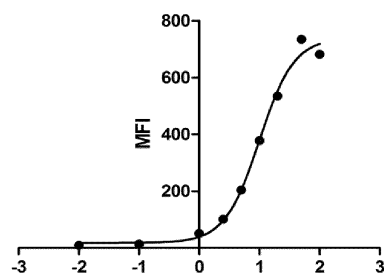
Log (концентрация)

Фиг. 44



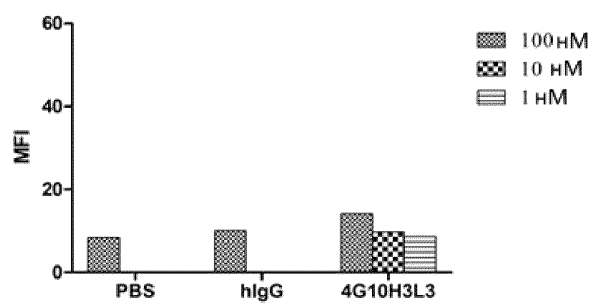
Log (концентрация)

Фиг. 45

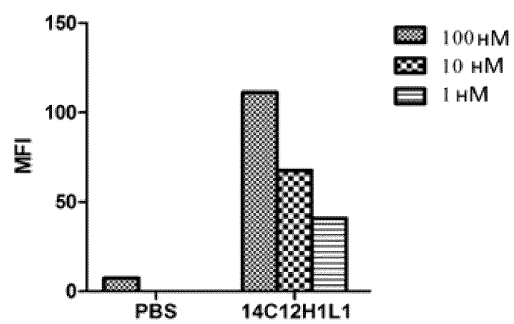


Log (концентрация)

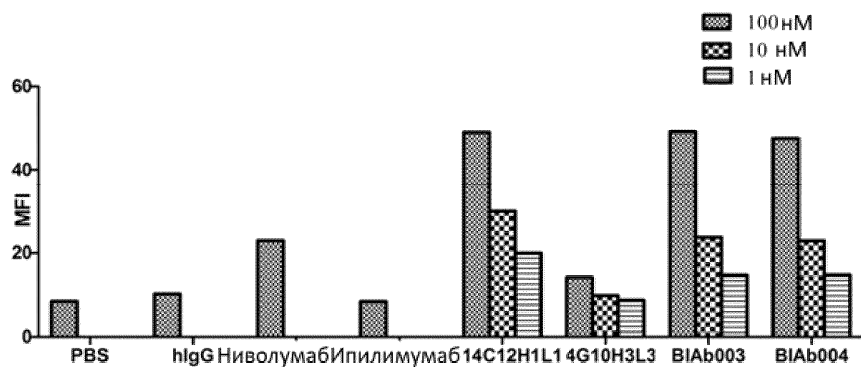
Фиг. 46



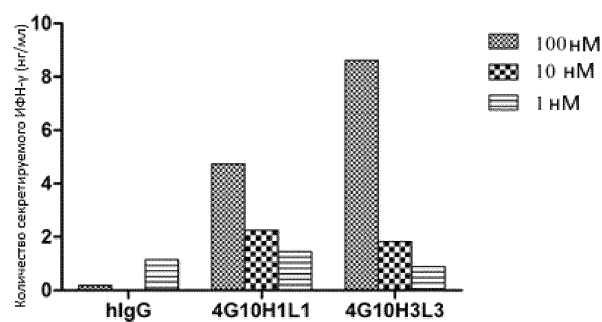
Фиг. 47



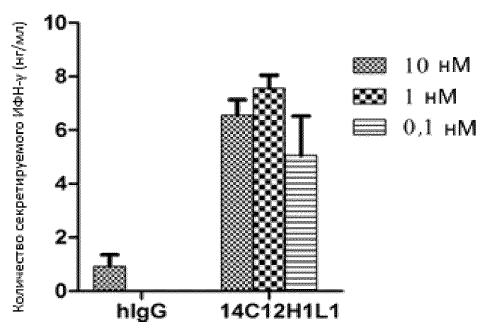
Фиг. 48



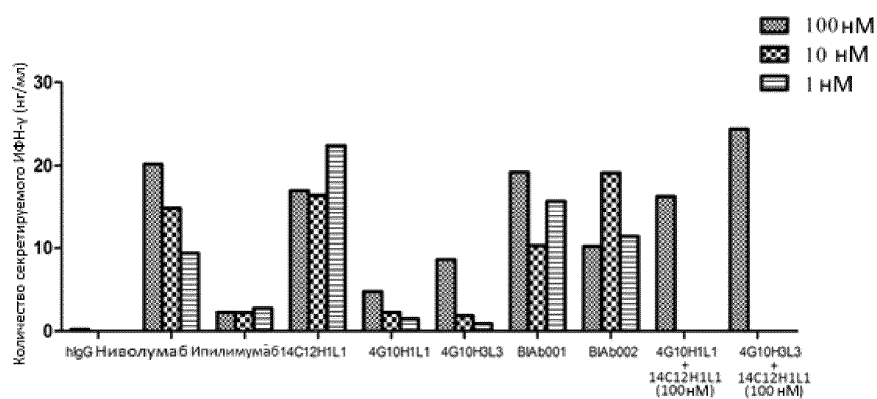
Фиг. 49



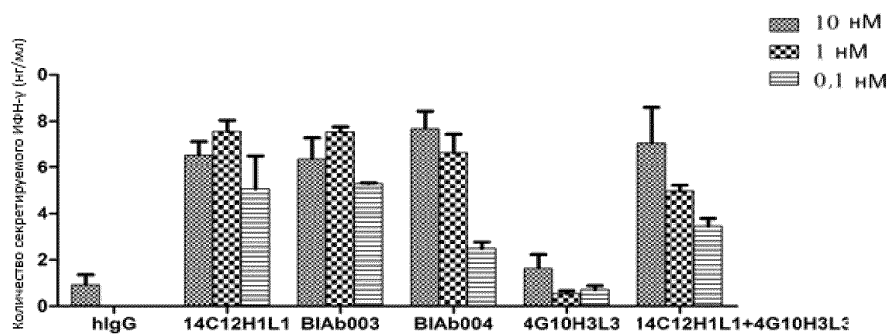
Фиг. 50



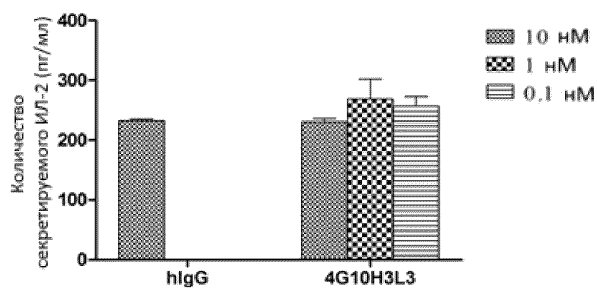
Фиг. 51



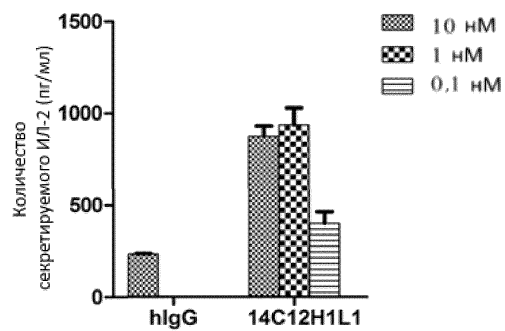
Фиг. 52



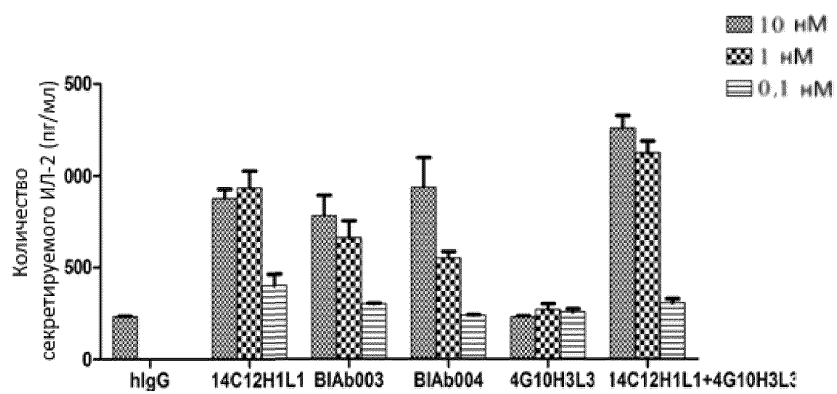
Фиг. 53



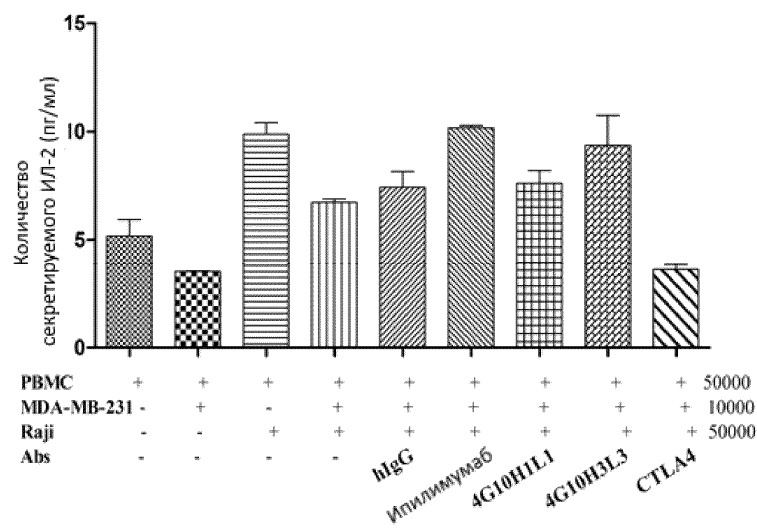
Фиг. 54



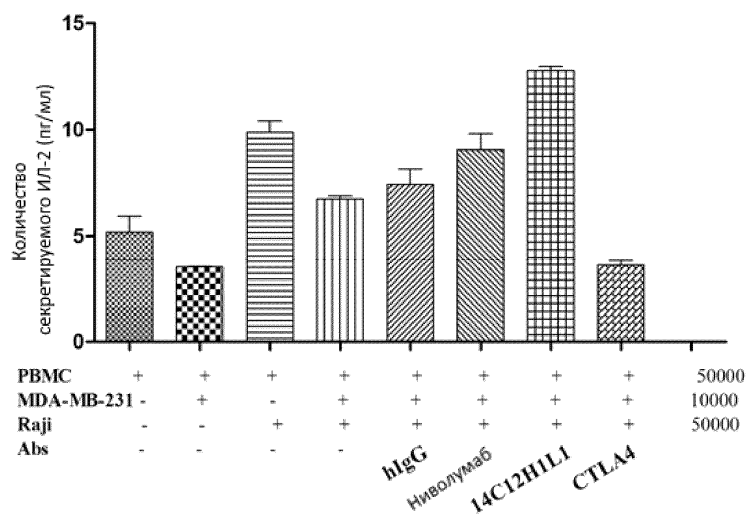
Фиг. 55



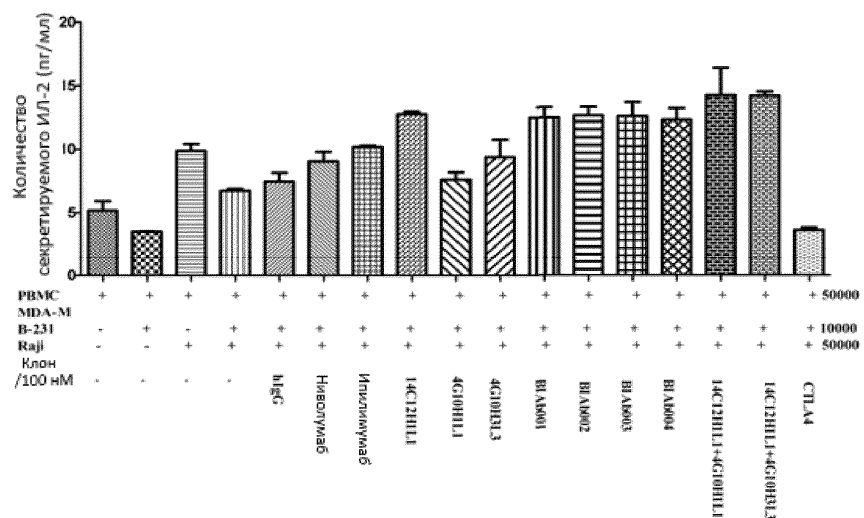
Фиг. 56



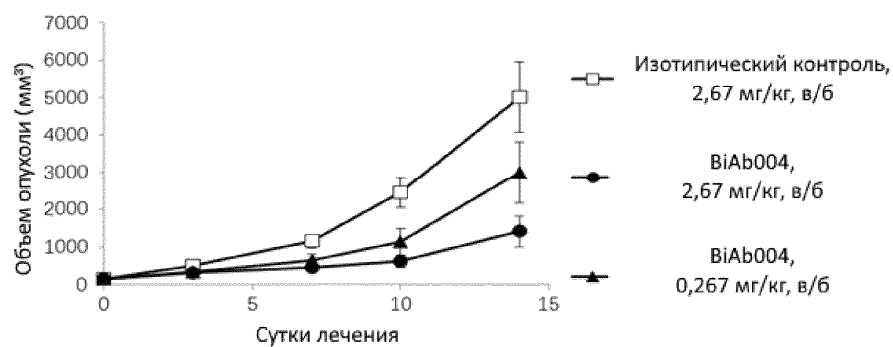
Фиг. 57



Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2