

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042736**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.21

(21) Номер заявки
201990171

(22) Дата подачи заявки
2017.09.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ EGFR И ПРОТИВ CD3 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **201610886938.7**

(32) **2016.10.11**

(33) **CN**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/CN2017/103896**

(87) **WO 2018/068652 2018.04.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЕЙДЗИН ДУНФАН БАЙОТЕК КО.
ЛТД.; БЕЙДЗИН ЦЗИНИТАЙСЯН
ТЕКНОЛОЖИ ДИВЕЛОПМЕНТ КО.
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Бай И, Чжан Вэнь, Сюй Мэн, Пэй
Шуан, Цзань Яньлу, Вэнь Шэнмэй
(CN)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В. (RU)**

(56) **CN-A-106632681
WO-A1-2016115274
WO-A1-2016115274
CN-A-104774268
CN-A-1133886
WO-A2-2005004809
CN-A-104341504
CN-A-104203981
US-A1-2012189630
REUSCH U. et al.: Anti-CD3XAnti-Epidermal
Growth Factor Receptor (EGFR) Bispecific Antibody
Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive
Cancers In vitro and in an Animal Model. Clin. Cancer
Res. 01 January 2006 (01.01.2006), 12(1), pp. 183-190
ASANO R. et al.: Highly Enhanced
Cytotoxicity of a Dimeric Bispecific Diabody, the
hEx3 Tetrabody. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL
CHEMISTRY. 02 July 2010 (02.07.2010), 285(27),
pp. 20844-20849**

(57) В изобретении предложено биспецифичное антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и против кластера дифференциации (CD3) и его применение. Данное биспецифичное антитело может специфично связываться с антигеном-рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) на поверхности опухолевой клетки и с антигеном-молекулой CD3 на поверхности иммунной клетки. Одноцепочечное антитело (ScFv) антитела против CD3 расположено на C-конце константной области антитела против EGFR. Кроме того, предложены способ получения биспецифичного антитела и клинические применения данного биспецифичного антитела. Биспецифичное антитело имеет высокую аффинность и используется для лечения опухолевых заболеваний, вызванных высокой экспрессией или ненормальной экспрессией EGFR, и других заболеваний, вызванных другой сверхэкспрессией EGFR.

B1**042736****042736****B1**

Область изобретения

Данное изобретение относится к области биотехнологии и, в частности, к способу конструирования и получения биспецифичного антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и кластера дифференциации 3 (CD3), и к применениям данного антитела при заболеваниях.

Предшествующий уровень техники

Биспецифичное антитело (BiAb) представляет собой искусственное антитело, состоящее из двух разных фрагментов антитела, и оно способно специфично распознавать и связываться с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами.

Моноклональные антитела широко применяются для лечения рака, воспаления и других заболеваний. Поскольку все данные антитела имеют одну мишень, многие пациенты могут не полностью отвечать на монотерапию и часто имеют резистентность к лекарственным средствам. Биспецифичное антитело способно одновременно распознавать два разных антигена или эпитопа и может служить в качестве средства для перенаправления иммунологических эффекторных клеток, таких как природные клетки-киллеры и Т-клетки, и усиливать эффект гибели опухолевых клеток. Кроме того, биспецифичное антитело может быть дополнительно расположено на двух разных антигенах той же самой клетки с изменением клеточных сигналов, включающих сигнал распространения рака или воспалительный сигнал. В результате долговременных исследований и разработок появляются многие формы биспецифичных антител, такие как биспецифичное микроантитело, двухцепочечное антитело, одноцепочечное двухвалентное антитело, многовалентное биспецифичное антитело и тому подобные. Данные биспецифичные антитела главным образом делят на две главные категории: Fc-содержащие антитела и антитела, не содержащие Fc. Первое имеет превосходную растворимость, стабильность и период полувыведения, тогда как Fc-антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC) могут давать некоторые аддитивные эффекты, необходимые для лечения. В отличие от этого Fc-дефицитное биспецифичное антитело полностью зависит от способности к связыванию с антигеном для достижения терапевтического эффекта. Кроме того, белок Fc может продлевать период полувыведения лекарственного белка (или пептида) *in vivo*, продлевая, посредством этого, время действия активной молекулы *in vivo*.

Антиген поверхности опухолевой клетки рецептор эпидермального фактора роста (EGFR): рецептор эпидермального фактора роста широко распространен на мембране эпителиальных клеток, за исключением сосудистых тканей. В качестве трансмембранного белка с молекулярной массой примерно 180 кДа, EGFR имеет индуцируемую лигандом тирозин-протеинкиназную активность и является членом консервативного семейства рецепторов ErbB. Другие члены данного семейства включают HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3 и HER4/ErbB4. Общие характеристики рецепторов ErbB являются следующими: каждый рецептор ErbB включает внеклеточный (EC) лигандсвязывающий домен, один трансмембранный домен, состоящий из двух повторяющихся областей, богатых цистеином, и внутриклеточную последовательность, включающую тирозин-протеинкиназу и сайты автофосфорилирования; после связывания лигандов и рецепторов происходит димеризация рецепторов, и образуются гомодимеры или гетеродимеры; димеризованные рецепторы подвергаются перекрестному фосфорилированию с активацией подобласти TK во внутриклеточной области таким образом, чтобы возбудить трансдукцию сигнала следующего уровня, вызывая посредством этого пролиферацию и трансформацию клеток. EGFR связан с пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, инвазией опухоли, метастазами и ингибированием апоптоза клеток, и механизмы включают: усиление последующей трансдукции сигнала, вызванное высокой экспрессией EGFR, продолжительную активацию EGFR, вызванную увеличением экспрессии мутантного рецептора EGFR или лиганда, усиление действия аутокринной петли, нарушение механизма понижающей регуляции рецептора, активацию ненормального пути трансдукции сигнала и тому подобное. Исследование показывает то, что EGFR имеет высокую экспрессию или ненормальную экспрессию во многих солидных опухолях и связан с пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, инвазией опухоли, метастазами и ингибированием апоптоза клеток. Сверхэкспрессия EGFR играет важную роль в прогрессировании опухоли, и сверхэкспрессия EGFR существует в тканях спонгиозитомы, рака легкого, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и тому подобных.

Антиген поверхности иммунной клетки кластер дифференциации 3 (CD3): молекула CD3 является важным антигеном дифференциации на мембране Т-клетки, является характерным признаком зрелых Т-клеток и состоит из 6 пептидных цепей.

Комплекс TCR-CD3 состоит из рецептора Т-клетки CD3 (TCR) с нековалентными связями. Молекула CD3 участвует во внутрицитоплазматической сборке комплекса TCR-CD3 и передает сигнал стимулирования антигеном посредством активационного мотива на основе тирозина иммунорецептора (ITAM) цитоплазматического домена каждой полипептидной цепи. Главные эффекты молекулы CD3 включают стабилизацию структуры TCR и передачу активационного сигнала Т-клетки. После специфичного распознавания и связывания TCR с антигенами CD3 участвует в трансдукции сигнала в цитоплазму Т-клетки. В качестве первого сигнала, индуцирующего активацию Т-клеток, CD3 играет важную роль в распознавании антигена Т-клеткой и процессах генерации иммунного ответа.

В медицине, в частности в иммунотерапии опухолей, биспецифичное антитело имеет превосходные

эффекты и перспективы, способно одновременно связываться с частями опухолевых клеток и специфичными иммунно-активными клетками CD16 против антигена или CD3 на иммунных клетках, и имеет эффект активации NK-клеток (природный киллер) или Т-клетки. Часть против специфичного для опухоли антигена может специфично связываться с опухолевыми клетками, иммунные клетки нацеливаются на данные опухолевые клетки, и увеличивается концентрация местных NK-клеток или Т-клеток, обеспечивая посредством этого достижение иммунологическими эффекторными клетками эффекта специфичной гибели опухолевых клеток. В предшествующем уровне техники не существует успешно распространяемого на рынке лекарственного средства на основе биспецифичного антитела против EGFR и CD3, и данную технологию следует исследовать.

По отношению к китайскому патенту CN 201510030519.9 в настоящем изобретении заимствовано четырехвалентное биспецифичное антитело, и биологическая активность антитела против EGFR полностью сохраняется; данное четырехвалентное биспецифичное антитело способно хорошо распознавать опухолевый антиген и эффекторные клетки (Т-клетки, NK-клетки и тому подобное), посредством этого хорошо достигая биологической активности биспецифичного антитела. В патенте Соединенных Штатов US 9249217 B2 принята форма одноцепочечного антитела ScFv-ScFv (BITE), и BITE является двухвалентным и не имеет какого-либо фрагмента Fc. По сравнению с BITE, помимо преимуществ четырехвалентного антитела, в данном изобретении дополнительно содержатся фрагменты Fc; и данные фрагменты Fc способны продлевать период полувыведения эффекторных молекул *in vivo*, продлевая, посредством этого, время действия эффекторных молекул *in vivo*.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно данному изобретению предложено биспецифичное антитело. В данном биспецифичном антителе добавлена последовательность ScFv против кластера дифференциации 3 (CD3) на С-конце антитела против EGFR. Данное биспецифичное антитело сохраняет полную молекулярную структуру антитела против EGFR и увеличивает способность к связыванию с антигеном CD3, в связи с этим поддерживая биологическую активность исходного антитела против EGFR *in vivo*, в то же самое время нацеливая иммунологические эффекторные клетки на опухолевые клетки посредством специфичного распознавания двух разных антигенов, увеличивая посредством этого влияние иммунологических эффекторных клеток на гибель опухолевых клеток.

Согласно изобретению предложено биспецифичное антитело против EGFR и против CD3 и его применение.

Данное биспецифичное антитело включает: (а) полное моноклональное антитело, (б) одноцепочечное антитело ScFv и (в) линкер; (а) специфично связывается с антигеном EGFR и состоит из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела; (б) специфично связывается с антигеном CD3 иммунной клетки и (б) относится к двум одноцепочечным антителам ScFv; причем два одноцепочечных антитела ScFv (б) соответственно связаны с С-концами двух тяжелых цепей антитела (а) посредством линкера (в).

Здесь линкер (в) в биспецифичном антителе имеет аминокислотную последовательность (GGGGX)_n, X включает Ser или Ala, предпочтительно Ser; и n представляет собой целое число 1-4, предпочтительно 3.

Здесь полное моноклональное антитело (а) в биспецифичном антителе состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, каждая тяжелая цепь и каждая легкая цепь соединяются дисульфидными связями, и две тяжелые цепи соединяются дисульфидными связями в шарнирной области. Вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей специфично связываются с антигеном EGFR опухолевых клеток.

Здесь константная область тяжелой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG2.

Здесь аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO:8, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO:9.

Здесь обе аминокислотные последовательности двух одноцепочечных антител ScFv (б) представляют собой SEQ ID NO:7.

Здесь каждое из одноцепочечных антител ScFv (б) состоит из вариабельной области тяжелой цепи, линкера (в) и вариабельной области легкой цепи, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи специфично связываются с антигеном CD3 на поверхности иммунной клетки; и линкер (в) имеет аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, где n представляет собой целое число 1-4, предпочтительно (GGGGS)₃.

Здесь сконструирован экспрессионный вектор биспецифичного антитела, здесь биспецифичное антитело может быть сконструировано в векторе или, соответственно, сконструировано в двух разных векторах.

Здесь сконструированный вектор трансфицируется в клетку-хозяина посредством способа генной инженерии, и клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего, такую как клетка CHO (клетка яичника китайского хомяка), клетка NS0 (клетка миломы мыши) или клетка другого млекопитающего, предпочтительно клетка CHO.

Здесь биспецифичное антитело получают традиционным способом получения иммуноглобулинов, включающим аффинную хроматографию на белке А и ионообменную, гидрофобную хроматографию или способ молекулярного сита.

Здесь биспецифичное антитело используется для лечения против опухолевых тканей с высокой экспрессией или ненормальной экспрессией EGFR и других заболеваний, вызванных сверхэкспрессией EGFR.

Здесь полное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело.

С принятием приведенных выше технических решений данное изобретение включает следующие полезные технические эффекты.

Биспецифичное антитело в данном изобретении находится в форме четырехвалентного антитела, и данная форма четырехвалентного антитела полностью сохраняет последовательность антитела, связывающуюся с антигеном опухоли, и имеет высокую аффинность. Тем временем, четырехвалентное биспецифичное антитело может лучше связывать опухолевые клетки и эффекторные клетки, являясь, посредством этого, более способствующим биологическим функциям биспецифичного антитела. По сравнению с обычной формой биспецифичного антитела - BITE, молекула в данном изобретении дополнительно включает фрагмент Fc; и существующий фрагмент Fc может продлевать период полувыведения лекарственной молекулы *in vivo*, что обеспечивает достижение лекарственной молекулой лучших эффектов, уменьшает частоту введения у пациентов, и облегчает боль пациентов. Данное изобретение используется для лечения против опухолевых тканей с высокой экспрессией или ненормальной экспрессией EGFR и других заболеваний, вызванных сверхэкспрессией EGFR.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 схематично показана схематическая диаграмма молекулы биспецифичного антитела;
на фиг. 2 схематично показана диаграмма построения экспрессионной плазмиды биспецифичной молекулы;
на фиг. 3 схематично показана электрофореграмма очищенной биспецифичной молекулы, денатурированной SDS (додецилсульфат натрия);
на фиг. 4 схематично показано выявление способности к связыванию биспецифичной молекулы с антигеном посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ);
на фиг. 5 схематично показано связывание биспецифичного антитела и клетки A431;
на фиг. 6 схематично показано связывание биспецифичного антитела и клетки Jurkat;
на фиг. 7 схематично показано опосредованное биспецифичным антителом связывание PBMC (одноядерная клетка периферической крови) с A431;
на фиг. 8 схематично показан опосредованный биспецифичным антителом эффект гибели H520 посредством PBMC.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение далее подробно описывается ниже с конкретными воплощениями и в комбинации с графическими материалами.

Согласно изобретению предложено биспецифичное антитело против EGFR и против CD3 и его применение. Данное биспецифичное антитело включает: (а) полное моноклональное антитело, (б) одноцепочечное антитело ScFv и (в) линкер; здесь (а) специфично связывается с антигеном EGFR и состоит из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела, (б) специфично связывается с антигеном CD3 иммунной клетки и (б) относится к двум одноцепочечным антителам ScFv; причем два одноцепочечных антитела ScFv (б) соответственно связаны с С-концами двух тяжелых цепей антитела (а) посредством линкера (в).

Кроме того, предпочтительно линкер (в) в биспецифичном антителе имеет аминокислотную последовательность (GGGGX)_n, X включает Ser или Ala, предпочтительно Ser; и n представляет собой целое число 1-4, предпочтительно 3.

Кроме того, предпочтительно полное моноклональное антитело (а) в биспецифичном антителе состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, каждая тяжелая цепь и каждая легкая цепь соединяются дисульфидными связями, и две тяжелые цепи соединяются дисульфидными связями в шарнирной области. Вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей специфично связываются с антигеном EGFR поверхности опухолевой клетки.

Кроме того, предпочтительно константная область тяжелой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG2.

Кроме того, предпочтительно аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3;

здесь SEQ ID NO: 1 (аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи нимогузумаба):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYYIYVWKQRPQGQLEWIGGI
NPTSGGSNFKNEKFKTKATLTVDSESTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRQGLWFDSDG
RGFDWVGOGTTLTVSS

SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи цетуксимаба):

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGV
WSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEF
YWGOGTLVTVA

SEQ ID NO: 3 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи пантумаба);

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIG
HIYYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSVTAADTAIYYCVRDRVTFAGDIW
GOGTMVTVSS

Здесь аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из SEO ID NO: 4, SEO ID NO: 5 или SEO ID NO: 6.

SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи нитомуз-маба):

DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSGNTYLDWYLQKPGQSPNLLI
YKVSNRFGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCYFQYSHVPWTFGGGTKL
EIK

SEQ ID NO: 5 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи цетуксимаба):

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESI
SGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCOONNNWPTTFGAGTKLELK.

SEQ ID NO: 6 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи панитумумаба):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN
LETGVPSRFGSGSGTDFETFTISSLOPEDATYFCOHFDHPLPLAFGGGTKEYEIK.

Кроме того, предпочтительно аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO: 8, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO: 9,

здесь SEQ ID NO: 8 (аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела против CD3):

DIKLQSGAEALRPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGY
INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARYYDDHYCL
DYWGOGTTLTVSS

SEQ ID NO: 9 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи одноцепочечного антитела против CD3):

DIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK
VASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCOOWSSNPLTFGAGTKLELK.

Кроме того, предпочтительно аминокислотные последовательности двух одноцепочечных антител ScFv (6) показаны здесь как SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность одноцепочечного антитела против CD3):

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWKQRPQGGLIEWIGY
INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCYARYDDHYCL
DYWGQGTTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS
SVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA
TYYCOOWSSNPLTFGAGTKLELK

Кроме того, предпочтительно каждое из одноцепочечных антител ScFv (б) состоит из вариательной области тяжелой цепи, линкера (в) и вариательной области легкой цепи, причем вариательная область тяжелой цепи и вариательная область легкой цепи специфично связываются с антигеном CD3 поверхности иммунной клетки; и линкер (в) имеет аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, здесь n представляет собой целое число 1-4, предпочтительно (GGGGS)₃.

Кроме того, предпочтительно сконструированный вектор трансфицируют в клетку-хозяина, представляющую собой прокариотическую клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего, такую как клетки CHO, клетки NS0 или другие клетки млекопитающих, предпочтительно клетки CHO.

Кроме того, предпочтительно биспецифичное антитело используют для лечения опухолевых тканей с высокой экспрессией или ненормальной экспрессией EGFR и других заболеваний, вызванных сверхэкспрессией EGFR.

Конкретное воплощение 1: конструирование экспрессионного вектора молекулы биспецифичного антитела.

а) Конструирование биспецифичного вектора для временной экспрессии

Конструируют соответствующие последовательности гена согласно форме биспецифичного антитела на фиг. 1. Выбирают PTSE в качестве экспрессионного вектора для клонирования и экспрессии генов легкой цепи против EGFR и слитых генов тяжелой цепи против EGFR-ScFv против CD3. Добавляют рестрикционные сайты Sall и BamHI в гены легкой цепи и слитые гены на обеих сторонах последовательностей кодирующей области, соответственно, и два данных гена синтезируют Taihe Biotechnology (Beijing) Co., Ltd. и соответственно клонируют в вектор PUC19. Трансформируют две плазмиды в TOP competence (Huitian Dongfang, № продукта HT702-03), получают минипрепарат с использованием набора для минипрепарата CWBio (продукт № CW0500), проводят рестрикционное расщепление рестрикционными ферментами Sall-HF и BamHI-HF, осуществляют гомологичную рекомбинацию, соответственно, с получением экспрессионных векторов (схематичные диаграммы показаны на фиг. 2А и 2Б), содержащих ген легкой цепи и слитый ген, и с названием плазмид PTSE-JY016L-TetBiAb и PTSE-JY016H-TetBiAb соответственно.

б) Конструирование биспецифичного экспрессионного вектора для стабильной трансформации

Выбирают PGN-2CMV, служащий в качестве экспрессионного вектора для клонирования и экспрессии генов легкой цепи против EGFR и слитых генов тяжелой цепи против EGFR-ScFv против CD3, причем данный вектор включает селективные маркеры в отношении неомицина и GS, два промотора CMV (цитомегаловирус) и соответствующие структурные единицы; осуществляют конструирование праймеров легкой цепи и слитого гена, вводят последовательность Козака, сигнальный пептид и соответствующие сайты разрезания рестрикционными ферментами и проводят синтез Taihe Biotechnology (Beijing) Co., Ltd.; с использованием плазмид PTSE-JY016L-TetBiAb и PTSE-JY016H-TetBiAb в качестве матрицы, осуществляют ПЦР-амплификацию с получением соответствующих полос, и проводят гомологичную рекомбинацию с вектором (профили плазмид показаны на фиг. 2В).

Конкретное воплощение 2: экспрессия и очистка молекулы биспецифичного антитела.

а) Экспрессия четырехвалентного антитела

Максиполучение плазмид проводят посредством применения максинабора, не содержащего эндотоксины (CWBio, CW2104), и осуществляют конкретные рабочие стадии согласно описанию, предоставленному в наборе.

Культивируют клетки эмбриональной почки человека (сuspензионные клетки HEK293ES) в экспрессионной среде FreeStyle 293 (Gibco, 12338-026), субкультивируют клетки один раз в каждые сутки или в двое суток, поддерживают исходную плотность субкультивируемых клеток $0,2-0,6 \times 10^6$ /мл, и объем культуры клеток должен составлять 15-35% от объема встряхиваемой колбы; колба с культурой клеток помещают на шейкер (скорость шейкера: 135 об./мин, температура: 37°C, CO₂: 5%); осуществляют субкультивирование клеток HEK293ES, которые находятся в логарифмической фазе и хорошем ростовом состоянии, до получения колбы с плотностью клеток $0,5 \times 10^6$ /мл за сутки до трансфекции, проводят культивирование на шейкере в течение ночи (135 об./мин, 37°C, 5% CO₂) и трансфицирование на следующие сутки.

Культивируют полученную суспензию клеток с плотностью 1×10^6 /мл на шейкере (135 об./мин, 39°C, 5% CO₂) в течение 2 ч до трансфекции, во время трансфекции последовательно добавляют PTSE-antiEGFR-H-TetBiAb (имеющей конечную концентрацию 0,5 мкг/мл), PTSE-antiEGFR-L (имеющей конечную концентрацию 0,5 мкг/мл) и полиэтиленimina (Sigma) (имеющего конечную концентрацию 2 мкг/мл), равномерно смешивают, котрансфицируют в суспензионные клетки HEK293ES и культивируют на шейкере (135 об./мин, 39°C, 5% CO₂) в течение 40 мин; непрерывно культивируют трансфицированные клетки на шейкере (135 об./мин, 37°C, 5% CO₂) и экспрессируют четырехвалентное антитело против EGFR и против CD3; затем трансфицируют в течение 96 ч и затем центрифугируют с получением экспрессионного супернатанта.

б) Очистка четырехвалентного биспецифичного антитела

Фильтруют экспрессионный супернатант с использованием 0,22 мкМ фильтрующей мембраны и получают антитело с доменом Fc из экспрессионного супернатанта с использованием колонки для аффинной хроматографии; соответственно, берут 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,0 и 0,1 M лимонную кислоту-цитрат натрия, pH 3,0, в качестве уравнивающего буфера и элюиционного буфера; проводят катионообменную хроматографию с получением целевого биспецифичного антитела, здесь катионообменной колонкой является HiTrap SP FF; уравнивают хроматографическую колонку SP уравнивающим буфером - 20 mM PB (фосфатный буфер), pH 6,3, элюируют элюирующим буфером - 20 mM MPB плюс 1 M NaCl (pH 6,3), и, наконец, изменяют концентрацию раствора с использованием буфера PBS (фосфатно-солевой буферный раствор). Очищенная посредством SDS-PAGE (электрофорез на полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) при восстанавливающих условиях биспецифичная молекула показана в виде фиг. 3. Здесь последовательность антитела против EGFR - Биспецифичное-1 - представляет собой последовательность нимотузумаба; последовательность антитела против EGFR -

Биспецифичное-2 - представляет собой цетуксимаб и последовательность антитела против EGFR - Биспецифичное-3 - представляет собой панитумумаб.

Конкретное воплощение 3: связывание молекул биспецифичных антител с молекулами CD3 и EGFR.

Осуществляют покрытие внеклеточной области EGFR или димера из субъединиц CD3E и CD3G внеклеточной области карбонатным буфером, pH 9,6, в течение ночи при следующих условиях: 100 нг/лунку/100 мкл при 4°C; промывка 300 мкл/лунку 0,1% буфера PBS(PBS-T) 5 раз и добавляют 1% BSA (бычий сывороточный альбумин)-PBS для блокирования при комнатной температуре в течение 2 ч, добавляют разные разбавления биспецифичных антител или соответствующих антител. Наивысшая концентрация каждого биспецифичного антитела (или антитела) составляет 1 мкМ; осуществляют разбавление в 3 раза, формируют 10 градиентов, в последнюю лунку добавляют только разбавители - PBS для того, чтобы они служили в качестве негативного контроля, и инкубируют при 37°C в течение 1 ч; затем промывают с помощью 300 мкл/лунку раствора PBS-T 5 раз и добавляют вторичное антитело против человеческого Fc, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена), разведенного 1:40000 1% BSA-PBS, инкубируют при 37°C в течение 1 ч; и проявляют набором для проявки на основе ТМВ (тетраметилбензидин), 100 мкл/лунку, в течение 8 мин при комнатной температуре и затем останавливают проявку 2 М H₂SO₄, 50 мкл/лунку и считывают при 450 нм/630 нм. Экспериментальные результаты показаны в виде фиг. 4. Способности всех биспецифичных антител к связыванию с EGFR являются аналогичными способностям соответствующих моноклональных антител, способность биспецифичного антитела, сконструированного из нимотузумаба, к связыванию с EGFR является аналогичной способности нимотузумаба (фиг. 4А); способность биспецифичного антитела, сконструированного из цетуксимаба, к связыванию с EGFR является аналогичной способности цетуксимаба (фиг. 4Б); и способность биспецифичного антитела, сконструированного из панитумумаба, к связыванию с EGFR является аналогичной способности панитумумаба (фиг. 4В)]; тогда как способности разных биспецифичных антител к связыванию с димерами CD3E и CD3G являются аналогичными (фиг. 4Г). Результаты показывают то, что форма биспецифичного антитела, принятая в изобретении, почти полностью сохраняет исходную способность антител связываться с антигенами; и, кроме того, способность ScFv против CD3 к связыванию с CD3 не является релевантной для разных антител, связанных с ним (фиг. 4Г).

Конкретное воплощение 4: связывание молекул биспецифичных антител с клетками, сверхэкспрессирующими EGFR или CD3.

а) Связывание биспецифичных антител и клеток A431

В данном изобретении линию опухолевых клеток (A431), сверхэкспрессирующую EGFR, принимают для выявления связывания разных биспецифичных антител и EGFR на поверхности клетки, соответствующее антитело используют в качестве позитивного контроля, и человеческий IgG (hIgG) используют в качестве изотипического контроля. Осуществляют расщепление 0,25% трипсином и центрифугирование для сбора клеток A431; при одновременном разбавлении разных антител, контроле наивысшей концентрации - 1 мкМ и проводят градиентное разбавление 3 раза; промывка отобранных клеток PBS плюс 1% BSA три раза, затем добавляют PBS плюс 1% BSA к ресуспендированным клеткам, распределяют клетки в 96-луночный планшет в дозе 1×10^5 клеток на лунку, добавляют 100 мкл разбавленных биспецифичных антител и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, центрифугируют для удаления супернатанта, промывают клетки PBS три раза, затем ресуспендируют клетки с использованием разбавленного антитела против человеческого IgG-Fc, меченного Alexa488, инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, промывают PBS три раза, ресуспендируют со 100 мкл PBS и выявляют интенсивности флуоресценции проточной цитометрией. Результаты анализируют с использованием Graphpad Prism. Результаты показывают то, что (фиг. 5) способность к связыванию каждого биспецифичного антитела и A431 сравнима с таковой соответствующего моноклонального антитела, тогда как связывание hIgG и A431 является очень слабым. Доказано, что биспецифичное антитело хорошо поддерживает активность родительского антитела, которое специфично связывается с EGFR на поверхности клетки.

б) Связывание биспецифичных антител и клеток Jurkat

Клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие CD3, используют для выявления связывания биспецифичных антител и CD3 поверхности клетки. Экспериментальный способ связывания биспецифичных антител и клеток Jurkat является аналогичным способу воплощения 4а, и различие заключается в том, что клетки Jurkat являются суспензионными клетками, тогда как клетки A431 представляют собой адгезивные клетки. Клетки Jurkat отбирают центрифугированием, добавляют разные антитела, и остальные операции являются такими же, как и операции в эксперименте с A431. Результаты показывают то, что (фиг. 6) способность изотипического контроля к связыванию с Jurkat является очень слабой; а разные биспецифичные антитела способны хорошо связываться с клетками, и способности трех биспецифичных антител к связыванию с клетками Jurkat являются согласующимися, что указывает на то, что способность ScFv против CD3 в биспецифичном антителе на фиг. 1 к связыванию с антигенами поверхности клетки на подвергается влиянию какого-либо антитела, связанного с ним.

Конкретное воплощение 5: эффект гибели опосредованных молекулой биспецифичного антитела РВМС на эффекторные клетки.

а) Мечение РКН26 в клетках А431 или Н520

А431 представляет собой штамм опухолевых клеток, способных сверхэкспрессировать EGFR, тогда как Н520 не экспрессирует EGFR. В данном эксперименте А431 служит в качестве опытного штамма клеток, тогда как Н520 служит в качестве негативного контроля.

Добавляют 2×10^6 клеток в 1,5 мл центрифужную пробирку для центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин, удаляют полной среды и, соответственно, очищают клетки дважды с использованием бессывороточной среды; ресуспендируют клетки с раствором разбавителя С в наборе РКН26, добавляют $2 \times$ РКН26 окрашивающего раствора в равном объеме (пропорция: растворяют 0,4 мкл маточного окрашивающего раствора в 100 мкл разбавителя С), равномерно смешивают и помещают при комнатной температуре на 1 мин; немедленно добавляют такой же объем 0,5% раствора BSA-PBS, что и объем раствора в пробирке, для завершения реакции добавляют 1 мл соответствующей полной среды для разбавления и ресуспендирования клеток, центрифугируют при 1500 об./мин в течение 5 мин для отбора клеточного осадка и культивируют клетки, ресуспендированные полной средой, в бутылки для культуры клеток для последующего применения.

б) Разделение РВМС

Добавляют 20 мл разделяющей среды для одноклеточных клеток в 50 мл пробирку, разбавляют отобранную кровь разбавителем для цельной крови согласно соотношению 1:1, затем равномерно перемешивают, медленно распределяют верхний слой разделяющей среды при постоянной скорости вдоль внутренних стенок пробирок Corning и доводят объем цельной крови в каждой пробирке до 20 мл; устанавливают каждую пробирку, заполненную жидкостью, в центрифугу, заранее охлажденную до 22°C, и проводят горизонтальное центрифугирование при 600 g в течение 15 мин (устанавливают ускорение и замедление 1); вынимают центрифужные пробирки после завершения центрифугирования, аккуратно отбирают пипеткой клеточный слой - одноклеточные клетки (РВМС) в распределении в виде дуги окружности между разделяющей средой и сывороткой и помещают в новую 50 мл пробирку; добавляют жидкость для промывки клеток в цитоплазматический матрикс согласно соотношению 1:5, полностью и равномерно перемешивают и центрифугируют, удаляют супернатант, повторно однократно промывают, отбирают клеточный осадок, ресуспендируют с использованием среды RPMI-1640 и культивируют клетки в бутылки для культивирования клеток для последующего применения.

в) Разделение с магнитными шариками Т-клеток CD3 плюс PBS (pH 7,2, содержащий 0,5% BSA, 2 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)), фильтруют, стерилизуют, и предотвращают образование пузырей.

Центрифугируют для удаления тромбоцитов крови (20°C, 200 g, 10-15 мин) и удаляют клеточный агрегат с использованием 30 мкм мембранного фильтра; отбирают клетки РВМС посредством центрифугирования при 200 g в течение 10 мин и удаляют супернатант; ресуспендируют 2×10^7 клеток в 60 мкл буфера плюс 20 мкл блокирующего реактива на основе FcR (рецептор Fc); добавляют 20 мкл магнитных шариков, равномерно перемешивают и инкубируют при 2-8°C в течение 15 мин; добавляют 1-2 мл буфера, центрифугируют при 300 g в течение 10 мин и удаляют супернатант; ресуспендируют посредством 500 мкл; помещают сортирующую колонку на штатив для сортировки и промывают 500 мкл; добавляют клеточную суспензию и отбирают несвязавшиеся клетки; промывают 500 мкл три раза после того, как жидкость вытекает из верхней части колонки; снимают сортирующую колонку со штатива для сортировки и помещают ее в пробирку для сбора, быстро промывают 1 мл, отбирают клетки, подсчитывают и отмечают соотношение жизнеспособных клеток.

г) Выявление влияния и функции биспецифичного антитела

Разбавляют согласно соотношению 1:3 из конечной концентрации 1 мкМ и образуют 10 градиентов в лунках в двойной повторности; устанавливают 2 контрольные лунки, не содержащие лекарственное средство, дополняют объем средой, затем равномерно смешивают маркированные клетки А431 или Н520 (2×10^4 клеток/лунку/50 мкл) и Т-клетки CD3 плюс (2×10^5 клеток/лунку/50 мкл) согласно необходимому количеству для применения, распределяют клетки в каждую лунку 96-луночного планшета с V-образным дном, и, в то же самое время, создают три проточные контрольные лунки следующим образом: (1) немаркированные клетки Raji (2×10^4 клеток/лунку), (2) маркированные клетки РКН26 (2×10^4 клеток/лунку) и (3) Т-клетки CD3 плюс (2×10^5 клеток/лунку); культивируют в течение 18 ч, добавляют краситель TO-PRO3 согласно соотношению 1:50000 после завершения инкубации и инкубируют в темноте при 37°C в течение 10 мин; одновременно создают проточный контроль (4) клеток, маркированных TO-PRO3; и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 5 мин, частично удаляют супернатант среды, ресуспендируют с 0,5% раствором BSA-PBS и осуществляют выявление проточным цитометром.

Расчетная формула:

Показатель смертности клеток % = $(1 - \text{число клеток РКН26}^+ \text{ TOPRO3}^- (\text{группа действия лекарственного средства}) / \text{число клеток РКН26}^+ \text{ TOPRO3}^- (\text{группа без действия лекарственного средства})) \times 100$

д) Анализ результатов

Как показано на фиг. 7, РВМС, опосредованная молекулой биспецифического антитела, имеет превосходящий эффект гибели на эффекторные клетки А431, сверхэкспрессирующие EGFR; тогда как соответствующее антитело и его hIgG имеют слабый эффект гибели. Тем временем, все биспецифические антитела имеют очень слабый эффект гибели на клетки H520, которые не экспрессируют EGFR, и имеют аналогичный эффект в отношении изотипического контрольного hIgG (фиг. 8). Это указывает на то, что эффекты гибели, проявляемые всеми сконструированными биспецифическими антителами, на клетки-мишени являются специфическими; и способности трех разных биспецифических антител к гибели специфических клеток-мишеней являются аналогичными, и показатель смертности клеток составляет примерно 80%. Приведенное выше описание показывает то, что биспецифические антитела на фиг. 1 имеют хорошую биологическую активность.

Выше приведены только предпочтительные воплощения изобретения, и они не предназначены для того, чтобы ограничивать данное изобретение. Для специалистов в данной области изобретение допускает разные модификации и изменения. Любые модификации, эквивалентные замены, улучшения и тому подобное, сделанные в пределах сущности и принципа данного изобретения, должны попадать в пределы объема защиты данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее: (а) полное моноклональное антитело, (б) одноцепочечное антитело (ScFv) и (в) линкер, где (а) специфично связывается с антигеном EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и состоит из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела; (б) специфично связывается с антигеном иммунных клеток кластер дифференцировки 3 (CD3) и (б) относится к двум одноцепочечным антителам ScFv; причем два одноцепочечных антитела ScFv (б) соответственно связаны с С-концами двух тяжелых цепей антитела (а) посредством линкера (в),

где аминокислотные последовательности вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи полного моноклонального антитела (а) представляют собой одну из трех комбинаций: SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 6;

где обе аминокислотные последовательности двух одноцепочечных антител ScFv (б) представляют собой SEQ ID NO: 7.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где линкер (в) имеет аминокислотную последовательность (GGGGX)_n, X представляет собой Ala или Ser и n представляет собой целое число 1-4.

3. Биспецифическое антитело по п.2, где X представляет собой Ser и n равен 3.

4. Биспецифическое антитело по п.1, где аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO: 8 и аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи одноцепочечного антитела ScFv (б) представляет собой SEQ ID NO: 9.

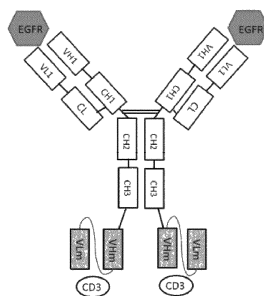
5. Биспецифическое антитело по п.1, где константная область тяжелой цепи полного моноклонального антитела (а) представляет собой одну из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

6. Экспрессионный вектор рекомбинантной ДНК, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифическое антитело по любому из пп.1-5.

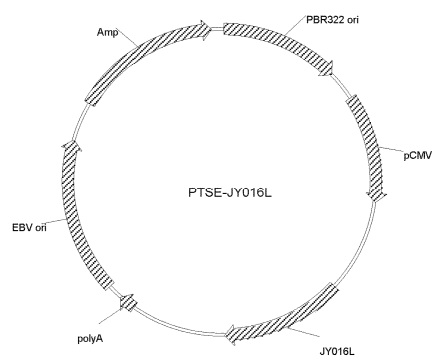
7. Клетка-хозяин, трансфицированная экспрессионным вектором рекомбинантной ДНК по п.6, представляющая собой прокариотическую клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп.1-5.

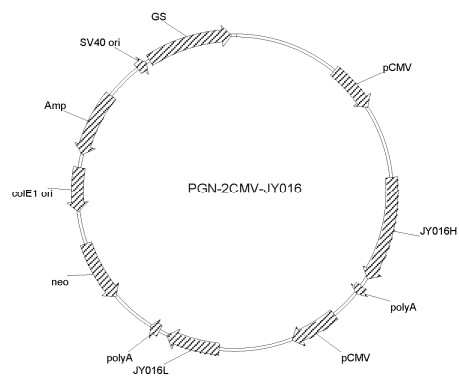
9. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-5 в получении лекарственного средства для лечения опухолевых заболеваний или других заболеваний, вызванных специфичной экспрессией антигена EGFR.



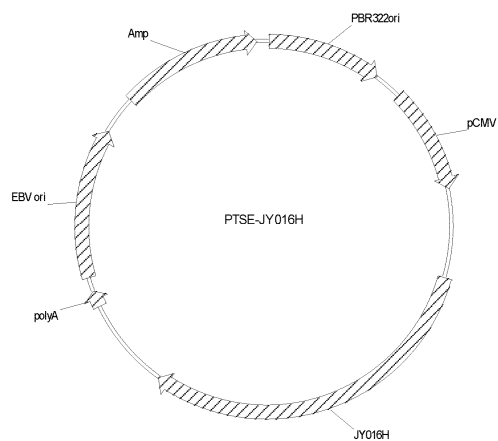
Фиг. 1



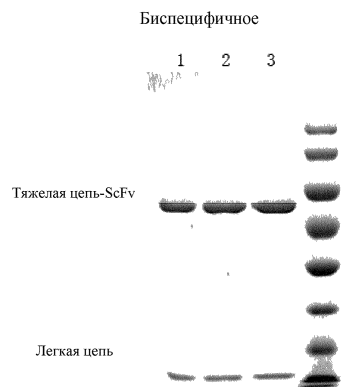
Фиг. 2А



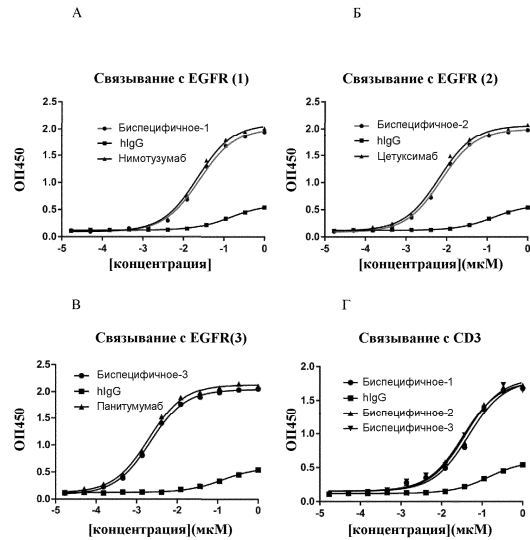
Фиг. 2Б



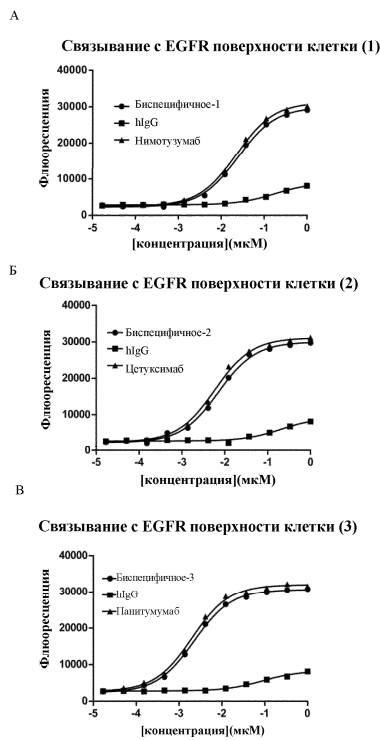
Фиг. 2



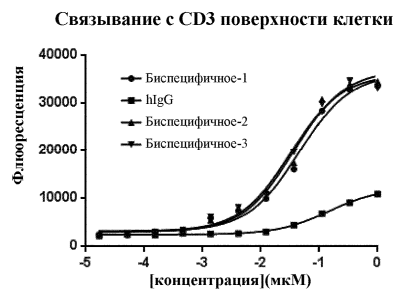
Фиг. 3



Фиг. 4А-Г

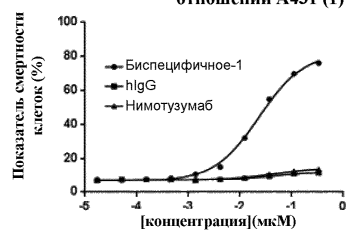


Фиг. 5А-В

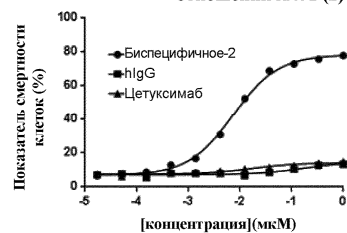


Фиг. 6

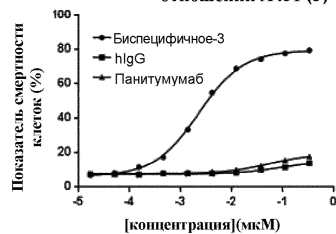
А Эффект гибели, проявляемый РВМС в отношении А431 (1)



Б Эффект гибели, проявляемый РВМС в отношении А431 (2)

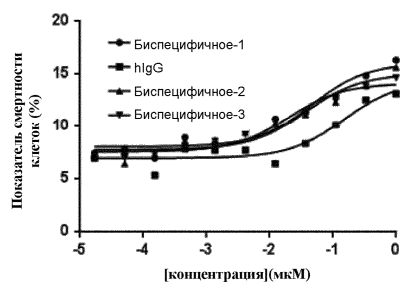


В Эффект гибели, проявляемый РВМС в отношении А431 (3)



Фиг. 7А-В

Эффект гибели, проявляемый РВМС в отношении H520



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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