

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043006**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

(21) Номер заявки
201990894

(22) Дата подачи заявки
2017.11.16

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

(54) АНТИ-PD-1/АНТИ-HER2 ГЕТЕРОДИМЕРНОЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО СО СТРУКТУРОЙ ПРИРОДНОГО АНТИТЕЛА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 201611016435.0

(32) 2016.11.18

(33) CN

(43) 2019.09.30

(86) PCT/CN2017/111310

(87) WO 2018/090950 2018.05.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЕЙДЖИН ХАНМИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)**

(56) WO-A1-2015095412

CN-A-105828837

CN-A-104114579

CN-A-104114579

CHOI, H.J. et al.: "Engineering of Immunoglobulin Fc Heterodimers Using Yeast Surface-Displayed Combinatorial Fc Library Screening", PLOS One, 10(12), 16 December 2015 (16.12.2015), ISSN: 1932-6203, abstract, and page 5

(72) Изобретатель:
**Лю Цзяван, Сун Нанмэн, Ян Япин,
Ким Мэнсон (CN)**

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

(57) В изобретении предложено анти-PD-1/анти-HER2 биспецифическое антитело гетеродимерной формы, обладающее характеристиками природного IgG, и способ его получения. Биспецифическое антитело связывается с обеими целевыми молекулами одновременно и его можно применять для лечения сложных заболеваний.

043006 B1

043006 B1

Область техники

Настоящее описание относится к анти-PD-1/анти-HER2 биспецифическому гетеродимерному анти-телу со структурой природного антитела и к способу его получения. Конкретно, настоящее в настоящем описании предложены высокостабильное анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерное биспецифическое антитело, обладающее характеристиками природного IgG и не имеющее ошибочного спаривания тяжелой цепи и легкой цепи, и способ его получения.

Предшествующий уровень техники

Моноклональные антитела представляют собой высокоспецифичные антитела, которые действуют только на одну антигенную детерминанту и широко используются при раке, воспалении, аутоиммунных заболеваниях, инфекционных заболеваниях и т.д. Однако такие терапевтические молекулы не проявляют достаточных фармакологических эффектов при применении по отдельности. Это связано со сложностью заболеваний. Например, рак или воспалительные заболевания часто связаны со взаимодействиями между молекулярными путями и сигнальными путями, которые опосредуют различные заболевания. В этом случае молекула, имеющая одну мишень, может не обеспечивать оптимальный терапевтический эффект, и терапевтический эффект может быть улучшен путем одновременной блокировки молекул, расположенных на нескольких мишенях или во многих сайтах на одной мишени. В то же время в случае терапии с двойным нацеливанием, использующей мультиспецифичность, например биспецифические молекулы, можно упростить процесс разработки новых лекарственных средств, так как биспецифическая молекула представляет собой одну молекулу. По сравнению с использованием комбинации нескольких моноспецифических молекул, этот метод является более удобным как для пациентов, так и для медицинских работников.

В данной области техники известно много разных типов биспецифических антител или бифункциональных молекул. Первое биспецифическое антитело было получено путем сочетания двух молекул IgG, фрагментов Fab' или (Fab')₂ с использованием химического метода и бифункционального реагента сочетания. Однако такое химически соединенное биспецифическое антитело имеет множество ограничений, включающих интенсивность производства, очистку гетерологичных продуктов сочетания, сложность удаления гомологичных продуктов сочетания, исходных моноспецифических антител или фрагментов, низкую эффективность и т.д.

Другим методом, используемым в получении биспецифических антител, является использование технологии гибридной гибридомы (квадромы), которая представляет собой способ получения биспецифического антитела путем соматического слияния двух типов клеточных линий гибридомы, которые секретируют разные антитела. Из-за произвольного спаривания тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов только одна десятая часть смеси антител является необходимым функциональным биспецифическим антителом, что усложняет процесс очистки и снижает выход продукции.

В WO 2013060867 описан способ массового получения гетеродимерного биспецифического антитела. В этом способе смесь двух видов гомодимерных антител сначала восстанавливают и асимметричные аминокислотные мутации вводят в домены СН3 двух видов гомодимерных антител, что способствует обмену Fab-фрагментов разных антител, а межцепочечные дисульфидные связи шарнирной области окисляют с образованием стабильного биспецифического антитела.

В WO 2009089004 описан способ получения гетеродимерного белка. В этом методе аминокислоты на границе контакта СН3-СН3 мутированы в заряженные аминокислоты, так что гетеродимеризация является электростатически благоприятным, а образование гомодимеров является электростатически неблагоприятным.

В US 5731168 описан способ получения гетеродимерного IgG с использованием стратегии "выступ в полость" (protuberance-into-cavity). В этом способе "выступы" создают путем замены небольших аминокислот на границе контакта домена СН3 первой цепи более крупными аминокислотами и в то же самое время "полости" создают путем замены соответствующих больших аминокислот домена СН3 второй цепи меньшими аминокислотами. Взаимодействие выступа и полости благоприятно для образования гетеродимерного IgG, но неблагоприятно для образования гомодимера.

В WO 2012058768 описан способ получения высокоспецифичного стабильного гетеродимерного IgG. Этот способ объединяет и негативную, и позитивную стратегии конструирования, а также методы структурного и компьютерного моделирования, основанные на инженерии белка, для мутаций множества аминокислот в структурном домене СН3 IgG1, с образованием тем самым стабильного гетеродимерного IgG с низким содержанием гомодимерных примесей.

Рецептор-1 программируемой смерти (PD-1) представляет собой контрольную точку иммунитета, которая в последнее время привлекает большое внимание и в основном участвует в контроле активации Т-клеток, а также регулирует силу и продолжительность иммунных реакций. В нормальных условиях PD-1 опосредует и поддерживает толерантность тканей организма и предупреждает повреждение аутологичной ткани, вызванное чрезмерной активацией иммунной системы во время воспалительного процесса, и, следовательно, оказывает положительное влияние на предупреждение аутоиммунных заболеваний. При патологических состояниях PD-1 участвует в возникновении и развитии опухолевого иммунитета и различных аутоиммунных заболеваний (Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(3):307-13. Hematol Oncol

Stem Cell Ther. 2014 Mar; 7(1):1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1):24-33. Immunity. 2013 Jul 25; 39(1):61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10; 33(17):1974-82.).

PD-1 принадлежит к семейству CD28, но в отличие от других членов семейства CD28, таких как CTLA4 и т. д., он может образовывать ковалентные димеры посредством дисульфидных связей и существует в мономерной форме. Структура PD-1 в основном включает внеклеточную вариабельную область иммуноглобулина в качестве структурного домена, гидрофобный трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен включает два независимых сайта фосфорилирования. Сайты фосфорилирования представляют собой иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и иммунорецепторный тирозиновый мотив переключения (ITSM). PD-1 индуцибельно экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, а также В-клеток, NK-клеток (естественных киллеров), моноцитов и клеток DC (дендритных клеток). Лиганды PD-1 включают лиганд 1 программируемой смерти (PD-L1) и лиганд 2 программируемой смерти (PD-L2), и эти лиганды относятся к семейству B7. Из них PD-L1 индуцибельно экспрессируется на поверхности различных иммунных клеток, включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, макрофаги, клетки DC, эндотелиальные клетки, эпидермальные клетки и т. д., но PD-L2 индуцибельно экспрессируется только на некоторых иммунных клетках, таких как макрофаги, клетки DC, В-клетки и т. д. (Autoimmun Rev, 2013, 12(11):1091-1100. Front Immunol, 2013, 4:481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1): 24-33.).

В 1980-х гг. Dennis Slamon впервые обнаружил сверхэкспрессию гена рецептора 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2) в 30% из 189 случаев первичного рака молочной железы и выявил, что HER2 тесно связан с общей выживаемостью и временем рецидива (Slamon DJ, et al., Science, 235:177-182, 1985). Согласно последним исследованиям, HER2 сверхэкспрессируется примерно у 25-30% пациентов с раком молочной железы (Revillion F et al., Eur J Cancer, 34:791-808, 1998), который ассоциируется со злокачественным прогрессированием опухолей (Wright C et al., Cancer Res, 49: 2087-2090, 1989).

Трастузумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против внеклеточного домена HER2 (Carter P et al., PNAS, 89(10):4285-4289, 1992). Однако противораковое действие трастузумаба в клинических исследованиях часто ниже, чем в доклинических исследованиях, и, следовательно, трастузумаб обычно используют в комбинации с химиотерапевтическими средствами. (Slamon DJ et al., N Engl J Med, 344:783-792, 2001).

Создание бифункциональных антител, способных рекрутировать эффекторные клетки, является эффективным средством улучшения эффективности антител. До настоящего времени большинство исследований проводилось для использования функции молекулы CD3. Целевая опухоль может быть эффективно удалена путем активации киллерных Т-клеток молекулой CD3 (Haas C et al., Immunobiology, 214:441-453, 2009). Среди них, BiTE, представляющий собой рекомбинантное бифункциональное стимулирующее Т-клетки антитело, разработанное Micromet, Inc., показало большие перспективы, но самая большая проблема состоит в том, что время его полужизни в сыворотке является очень коротким, и его время полужизни в организме человека составляет всего 1 ч (Loffler A et al., Blood, 95:2098-2103). Это связано со структурой самого BiTE. BiTE состоит из двух одноцепочечных фрагментов антител. Его молекулярная масса составляет всего 60 кДа, и Fc-фрагменты, которые играют важную роль в увеличении времени полужизни в молекуле антитела, удалены.

Катумаксомаб представляет собой другой тип многообещающего многофункционального антитела, и представляет собой гетеро-Ig-молекулу, нацеленную на CD3 и EpcAM (молекула адгезии эпителиальных клеток). В настоящее время этот продукт одобрен для лечения злокачественного асцита (Jager M et al., Cancer Res, 72:24-32, 2012). Еще одним многофункциональным антителом, находящимся в фазе II клинических испытаний, является эртумаксомаб, который нацелен на CD3 и HER2. Тяжелая и легкая цепи этого гетероантитела происходят от крысиного IgG и нацелены на CD3; а другие тяжелая и легкая цепи происходят от мышинового IgG и нацелены на HER2. Сопровождающая это проблема состоит в том, что получение этих продуктов является сложным. Для получения клонов, экспрессирующих бифункциональный эртумаксомаб, сначала получают одну гибридому, экспрессирующую антитело против CD3, и одну гибридому, экспрессирующую антитело против HER2, соответственно, и затем эти две гибридомы гибридизируют с получением квадromы, которая является бифункциональным антителом, способным экспрессировать анти-CD3 и анти-HER2. Обычно для получения антитела к одной мишени, необходима только одна гибридома. По сравнению с этим, процесс получения бифункционального антитела намного сложнее, и также намного сложнее получить квадromу, которая может привести к чрезвычайно высокой иммуногенности из-за ее крысиного происхождения.

Кроме того, наиболее очевидным побочным эффектом анти-CD3 антитела является кратковременный всплеск системного высвобождения цитокинов, также называемый "цитокиновым штормом". Соответственно, существует потребность в новом бифункциональном антителе, которое рекрутирует иммунные клетки к поверхности опухолевых клеток.

Описание воплощений техническая задача

Первый аспект настоящего изобретения относится к гетеродимерному биспецифическому антителу, включающему первый антигенсвязывающий функциональный домен, способный специфично связывать-

ся с PD-1, и второй антигенсвязывающий функциональный домен, способный специфично связываться с HER2. Биспецифическое антитело может включать первую цепь Fc и вторую цепь Fc, которые соединены друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей, где первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь соответственно связаны с антигенсвязывающим функциональным доменом PD-1 и антигенсвязывающим функциональным доменом HER2, а первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь включают 5 аминокислотных замен в следующих положениях:

1) аминокислотные замены в положениях 366 и 399 первой цепи Fc и аминокислотные замены в положениях 351, 407 и 409 второй цепи Fc или

2) аминокислотные замены в положениях 366 и 409 первой цепи Fc и аминокислотные замены в положениях 351, 399 и 407 второй цепи Fc, где первая и вторая цепи Fc, соответственно включающие указанные выше аминокислотные замены, имеют тенденцию подвергаться гетеродимеризации, а не гомодимеризации, и аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации KabatEU.

В одном воплощении аминокислотные замены в первой цепи Fc и второй цепи Fc являются следующими:

а) замена глицина, тирозина, валина, пролина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина или триптофана в положении 351;

б) замена лейцина, пролина, триптофана или валина в положении 366;

в) замена цистеина, аспарагина, изолейцина, глицина, аргинина, треонина или аланина в положении 399;

г) замена лейцина, аланина, пролина, фенилаланина, треонина или гистидина в положении 407 и

д) замена цистеина, пролина, серина, фенилаланина, валина, глутамин или аргинина в положении 409.

В одном воплощении аминокислотные замены могут включать:

а) замены T366L и D399R в первой цепи Fc и замены L351E, Y407L и K409V во второй цепи Fc;

б) замены T366L и D399C в первой цепи Fc и замены L351G, Y407L и K409C во второй цепи Fc;

в) замены T366L и D399C в первой цепи Fc и замены L351Y, Y407A и K409P во второй цепи Fc;

г) замены T366P и D399N в первой цепи Fc и замены L351V, Y407P и K409S во второй цепи Fc;

д) замены T366W и D399G в первой цепи Fc и замены L351D, Y407P и K409S во второй цепи Fc;

е) замены T366P и D399I в первой цепи Fc и замены L351P, Y407F и K409F во второй цепи Fc;

ж) замены T366V и D399T в первой цепи Fc и замены L351K, Y407T и K409Q во второй цепи Fc;

з) замены T366L и D399A в первой цепи Fc и замены L351W, Y407H и K409R во второй цепи Fc.

В одном воплощении, аминокислотные замены могут включать:

а) замены T366L и K409V в первой цепи Fc и замены L351E, Y407L и D399R во второй цепи Fc;

б) замены T366L и K409C в первой цепи Fc и замены L351G, Y407L и D399C во второй цепи Fc;

в) замены T366L и K409P в первой цепи Fc и замены L351Y, Y407A и D399C во второй цепи Fc;

г) замены T366P и K409S в первой цепи Fc и замены L351V, Y407P и D399N во второй цепи Fc;

д) замены T366W и K409S в первой цепи Fc и замены L351D, Y407P и D399G во второй цепи Fc;

е) замены T366P и K409F в первой цепи Fc и замены L351P, Y407F и D399I во второй цепи Fc;

ж) замены T366V и K409Q в первой цепи Fc и замены L351K, Y407T и D399T во второй цепи Fc;

з) Замены T366L и K409R в первой цепи Fc и замены L351W, Y407H и D399A во второй цепи Fc.

В одном воплощении первая цепь Fc имеет аминокислотные замены T366L и D399R и вторая цепь Fc имеет аминокислотные замены L351E, Y407L и K409V.

В одном воплощении цепь Fc получена из IgG.

В одном воплощении, антигенсвязывающими функциональными доменами PD-1 и HER2 являются фрагменты Fab или фрагменты scFv.

В одном воплощении, антигенсвязывающими функциональными доменами PD-1 и HER2 являются все фрагменты Fab.

В одном воплощении одним из антигенсвязывающих функциональных доменов PD-1 и HER является фрагмент Fab, а другим является фрагмент scFv.

В одном воплощении фрагмент Fab может включать первую переменную область тяжелой цепи и вторую переменную область тяжелой цепи, которые отличаются друг от друга, и первую переменную область легкой цепи и вторую переменную область легкой цепи, которые отличаются друг от друга.

В одном воплощении аминокислотная последовательность биспецифического антитела выбрана из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18.

Второй аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему гетеродимерное биспецифическое антитело, описанное в первом аспекте.

В одном воплощении последовательность полинуклеотида выбрана из SEQ ID NO: 1,3,6,7,9, 13, 15 и 17.

Третий аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной плазмиде, включающей выделенный полинуклеотид, описанный во втором аспекте.

В одном воплощении экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор X0GC, кото-

рый получают путем модификации pcDNA.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, включающей выделенный полинуклеотид, описанный во втором аспекте, или рекомбинантный экспрессионный вектор, описанный в третьем аспекте.

В одном воплощении клетка-хозяин выбрана из эмбриональной клетки почки человека НЕК293 или НЕК293Т, НЕК293F или НЕК293Е, полученных из клетки НЕК293; и клетки яичника китайского хомяка СНО или СНО-S, СНО-dhfr-, СНО/DG44 или ExpiСНО, полученных из клетки СНО.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к композиции, включающей гетеродимерное биспецифическое антитело, описанное в первом аспекте, выделенный полинуклеотид, описанный во втором аспекте, рекомбинантный экспрессионный вектор, описанный в третьем аспекте, или клетку-хозяин, описанную в четвертом аспекте, и фармацевтически приемлемый носитель.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу получения гетеродимерного биспецифического антитела, описанного в первом аспекте, включающему:

- 1) экспрессию выделенного полинуклеотида, описанного во втором аспекте, или рекомбинантного экспрессионного вектора, описанного в третьем аспекте, в клетке-хозяине;
- 2) восстановление каждого белка, экспрессированного в клетке-хозяине и
- 3) смешивание восстановленных белков и последующее окисление смеси.

В одном воплощении клетка-хозяин выбрана из эмбриональной клетки почки человека НЕК293 или НЕК293Т, НЕК293F или НЕК293Е, полученных из клетки НЕК293; и клетки яичника китайского хомяка СНО или СНО-S, СНО-dhfr-, СНО/DG44 или ExpiСНО, полученных из клетки СНО.

В одном воплощении восстановление может включать:

- 1) добавление восстановителя, где восстановителем является 2-меркаптоэтиламин, дитиотреитол, трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин, другие химические производные или их комбинации,
- 2) проведение реакции восстановления в присутствии дитиотреитола в концентрации 0,1 мМ или более при 4°C в течение не менее 3 ч и
- 3) удаления восстановителя путем обессоливания и т.д.

В одном воплощении, окисление может включать:

- 1) окисление на воздухе или добавление окислителя, где окислитель выбран из L-дегидроаскорбиновой кислоты и других химических производных, и
- 2) проведение реакции окисления в присутствии L-дегидроаскорбиновой кислоты в концентрации 0,5 мМ или более при 4°C в течение по меньшей мере 5 ч.

В одном воплощении способ может дополнительно включать выделение и очистку.

Седьмой аспект настоящего изобретения относится к применению гетеродимерного биспецифического антитела, описанного в первом аспекте, и/или выделенного полинуклеотида, описанного во втором аспекте, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора, описанного в третьем аспекте, и/или клетки-хозяина, описанной в четвертом аспекте, и/или композиции, описанной в пятом аспекте, в изготовлении лекарственных средства для предупреждения и/или лечения заболевания субъекта.

Восьмой аспект настоящего изобретения относится к применению гетеродимерного биспецифического антитела, описанного в первом аспекте, и/или выделенного полинуклеотида, описанного во втором аспекте, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора, описанного в третьем аспекте, и/или клетки-хозяина, описанной в четвертом аспекте, и/или композиции, описанной в пятом аспекте, в профилактике и/или лечении заболевания субъекта.

Девятый аспект настоящего изобретения относится к способу предупреждения и/или лечения заболевания, включающему введение гетеродимерного биспецифического антитела, описанного в первом аспекте, и/или выделенного полинуклеотида, описанного во втором аспекте, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора, описанного в третьем аспекте, и/или клетки-хозяина, описанной в четвертом аспекте, и/или композиции, описанной в пятом аспекте, субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном воплощении субъект может быть млекопитающим или предпочтительно может быть человеком.

В одном воплощении заболевание может быть выбрано из опухолей, таких как лейкоз, лимфома, миелома, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак носоглотки, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркома матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечноклеточный рак и меланома.

Полезные эффекты раскрытия

В настоящем изобретении было сконструировано совершенно новое анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерное биспецифическое антитело со структурой природного антитела с использованием PD-1 в качестве молекулы, рекрутирующей иммунные клетки, и HER2 в качестве целевой молекулы опухолевых клеток. Это биспецифическое антитело представляет собой высокостабильное анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерное биспецифическое антитело с характеристиками природного IgG и не имеющее ошибочно спаривания тяжелой цепи и легкой цепи. Биспецифическое антитело может связываться с обоими типами целевых молекул, PD-1 и HER-2, и, таким образом, может быть более эффективным в лечении

сложных заболеваний.

Краткое описание графических материалов

- На фиг. 1 показан пик элюирования мономера молекулы гетеродимерного антитела;
 На фиг. 2 показана структура молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 3 показана структура тяжелой цепи и легкой цепи молекулы полуантитела;
 На фиг. 4 показаны результаты анализа посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) тяжелой цепи и легкой цепи молекулы полуантитела, где А и В показывают результаты анализа молекулы анти-HER2 полуантитела и молекулы анти-PD-1 полуантитела соответственно;
 На фиг. 5 показаны результаты анализа SDS-PAGE окисленных молекул полуантител анти-PD-1 и анти-HER2 антител;
 На фиг. 6 показан пик элюирования молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 7 показаны результаты анализа SDS-PAGE молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 8 показаны результаты анализа SEC молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 9 показано тестирование стабильности молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 10 показано тестирование стабильности молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела;
 На фиг. 11 показана HER2-связывающая активность и PD-1-связывающая активность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела, где А и В демонстрируют HER2-связывающую активность и PD-1-связывающую активность соответственно;
 На фиг. 12 показано одновременное связывание молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела с PD-1-сверхэкспрессирующими CHO/PD-1 клетками и HER2-сверхэкспрессирующими SK-BR-3 клетками, где А-Д демонстрируют одновременное связывание моноклонального HER2-антитела, моноклонального PD-1 антитела, моноклонального HER2 антитела + моноклонального PD-1 антитела и анти-PD-1ВJHM/анти-HER2 соответственно;
 На фиг. 13 показана блокирующая активность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела в отношении связывания PD-1/PD-L1 и связывания PD-1/PD-L2, где А и В демонстрируют блокирующую активность в отношении PD-1/PD-L1 и PD-1/PD-L2 связывания соответственно;
 На фиг. 14 показана секреция цитокина IL-2, стимулируемая молекулой анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела; и
 На фиг. 15 показана площадь под кривой (AUC) для молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела.

Лучший вариант осуществления изобретения

Определения:

Ковалентная связь означает, что две цепи Fc или любая одна цепь Fc и антигенсвязывающий функциональный домен, связанный с ней в гетеродимерном биспецифическом антителе, связаны друг с другом посредством ковалентной связи с образованием одной молекулы. Из них цепь Fc включает первый антигенсвязывающий функциональный домен и второй антигенсвязывающий функциональный домен, связанный посредством одной или более ковалентных связей (или цепей дисульфидной связи); каждая из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи связана с одним антигенсвязывающим функциональным доменом посредством ковалентной связи (иминной связи или пептидной связи); и

Антигенсвязывающий функциональный домен представляет собой домен, в котором происходит специфическое взаимодействие с целевой молекулой, такой как антиген, и его действие является высоко-селективным, а последовательность, которая распознает одну целевую молекулу, не распознает последовательности других молекул. Типичный антигенсвязывающий функциональный домен включает переменную область антитела, структурный вариант переменной области антитела, рецепторсвязывающий домен, лигандсвязывающий домен или ферментсвязывающий домен.

Связь посредством одной или более цепей дисульфидных связей относится к образованию гетеродимерного фрагмента посредством связи между первой цепью Fc и второй цепью Fc с помощью одной или более цепей дисульфидных связей. В настоящем изобретении одна или более дисульфидных связей могут быть образованы, когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc и связанные с ним антигенсвязывающие функциональные домены синтезируются в одной и той же клетке, или могут быть образованы путем восстановления *in vitro* после того, как первая цепь Fc и вторая цепь Fc, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены синтезируются в разных клетках, соответственно.

Первая цепь Fc и вторая цепь Fc образуют связывающий фрагмент посредством ковалентной связи, а ковалентная связь включает дисульфидную связь и каждая цепь включает по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина; первая цепь и вторая цепь отличаются друг от друга своими аминокислотными последовательностями и содержат разные аминокислоты по меньшей мере в одном положении. В первой цепи Fc и во второй цепи Fc согласно настоящему изобретению существует

сильная сила отталкивания между одинаковыми цепями, а между разными цепями существует сила притяжения. Следовательно, первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь, или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены имеют тенденцию образовывать гетеродимеры при совместной экспрессии в клетке. Когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены экспрессируются в двух разных клетках-хозяевах, соответственно, первые цепи Fc, или первая цепь Fc и связанный с ней антигенсвязывающий функциональный домен не имеют тенденции образовывать гомодимеры, и вторые цепи Fc, или вторая цепь Fc и связанный с ней антигенсвязывающий функциональный домен также не имеют тенденции образовывать гомодимеры. В настоящем раскрытии, когда первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь, или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены экспрессируются в двух разных клетках-хозяевах, соответственно, и присутствует восстановитель, процент гомодимеров составляет менее 50%, то есть процент мономеров (одна цепь Fc, или одна цепь Fc и один связанный с ней антигенсвязывающий функциональный домен) составляет 50% или более.

Иммуноглобулин имеет симметричную структуру с четырьмя полипептидными цепями; две цепи представляют собой идентичные тяжелые цепи, которые являются относительно длинными и имеют относительно высокую молекулярную массу, каждая из этих цепей включает от 450 до 550 аминокислотных остатков и имеет относительную молекулярную массу от 55000 до 70000 Да; и две другие цепи представляют собой идентичные легкие цепи (L-цепи), которые являются относительно короткими и имеют относительно низкую молекулярную массу, каждая из этих цепей включает 210 аминокислотных остатков и имеет относительную молекулярную массу примерно 24000 Да. Примерно 110 аминокислотных последовательностей вблизи N-конца тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина являются высоковариабельными, и эта область называется вариабельной областью (V-область), а остальные аминокислотные последовательности вблизи их C-конца являются относительно стабильными и называются константной областью (C-область). Вариабельная область тяжелой цепи занимает примерно $\frac{1}{4}$ длины тяжелой цепи, а константная область занимает примерно $\frac{3}{4}$ длины тяжелой цепи. 5 известных типов иммуноглобулинов представляют собой IgG(γ), IgA(α), IgD(δ), IgM(μ) и IgE(ϵ). Среди них первые три вида иммуноглобулинов имеют три константные области, состоящие из CH1, CH2 и C3 в цепи H и последние два типа иммуноглобулинов (IgM и IgE) имеют один домен VH и четыре константных домена, то есть CH1-CH4 в цепи H. Константная область представляет собой каркас молекулы иммуноглобулина, а также является одной из областей, активирующих иммунные ответы.

Часть константной области по настоящему изобретению включает по меньшей мере область взаимодействия первой цепи Fc и второй цепи Fc, и, в случае IgG, эта область расположена в любых аминокислотных положениях домена CH3 и включает по меньшей мере GLN347, TYR349, THR 350, LEU 351, SER 354, ARG 355, ASP 356, GLU 357, LYS 360, SER 364, THR 366, LEU 368, LYS 370, ASN390, LYS392, THR394, PRO395, VAL 397, ASP399, SER400, PHE405, TYR407, LYS409, LYS439.

Первая цепь Fc и вторая цепь Fc, каждая из которых связана с одним антигенсвязывающим функциональным доменом посредством ковалентной связи или линкера, указывают первую цепь Fc и вторую цепь Fc, каждая из которых связана с антигенсвязывающим фрагментом одного антитела, или одноцепочечным антителом, способным распознавать антиген, или другим вариантом фрагмента антитела, способным распознавать антиген, или рецептором, способным распознавать лиганд, или лигандом, способным распознавать рецептор, посредством ковалентной связи или линкера. Ковалентная связь представляет собой тип химической связи, в которой два или более атомов вместе используют свои внешние электроны, в идеальном случае электронного насыщения таким образом образуется относительно стабильная химическая структура, или образуется взаимодействие между атомами посредством общей электронной пары. Атомы одного и того же элемента или атомы разных элементов все могут быть связаны ковалентной связью. Ковалентная связь первой цепи Fc и второй цепи Fc по настоящему изобретению может включать амидную связь, образованную посредством дегидратации между аминогруппой аминокислоты одной молекулы и карбоксильной группой аминокислоты другой молекулы, или амидную связь между альдегидной группой этиленгликоля или полиэтиленгликоля или другого соединения или их полимера и аминогруппой аминокислоты одной молекулы, но не ограничена ими. Линкер представляет собой одну аминокислотную последовательность, или одно соединение, или один мультимер одного соединения, способный связывать две полипептидные цепи посредством ковалентной связи. Из них одна аминокислотная последовательность может включать, без ограничения им, небольшой пептид, такой как GGGGSGGGGSGGGGS, и аминокислотная последовательность может связывать первую цепь Fc или вторую цепь Fc и одноцепочечное антитело, способное распознавать антиген или другой структурный вариант фрагмента антитела, способный распознавать антиген, посредством амидной связи.

Первая цепь Fc и вторая цепь Fc имеют тенденцию образовывать гетеродимеры и не имеют тенденции образовывать гомодимеры; это означает, что в первой цепи Fc и во второй цепи Fc существует сильная сила отталкивания между одинаковыми полипептидными цепями и между различными полипептидными цепями существует сила притяжения, и, следовательно, первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь, или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены имеют

тенденцию образовывать гетеродимеры, когда совместно экспрессируются в клетке. Когда первая цепь Fc и вторая цепь Fc, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные домены экспрессируются в двух разных клетках-хозяевах, соответственно, первые цепи Fc или первая цепь Fc и связанный с ней антигенсвязывающий функциональный домен не имеют тенденции образовывать гомодимеры, и вторые цепи Fc или вторая цепь Fc и связанный с ней антигенсвязывающий функциональный домен также не имеют тенденции образовывать гомодимеры.

Система нумерации Kabat EU означает присвоение номера каждой аминокислоте в последовательности антитела и этот метод присвоения номеров остаткам является стандартным в данной области. Метод Kabat можно распространить на другие антитела, не включенные в его компендиум, путем выравнивания целевого антитела с одной из консенсусных последовательностей в Kabat с учетом консервативных аминокислот.

Область Fc-фрагмента относится к кристаллизующемуся фрагменту (Fc), соответствует структурным доменам CH2 и CH3 Ig, и представляет собой фрагмент, где происходит взаимодействие между Ig и эффекторной молекулой или клеткой.

IgG является аббревиатурой для иммуноглобулина G (IgG) и является основным типом антител в сыворотке крови. Человеческий IgG имеет четыре подкласса IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, основанных на антигенных различиях в г-цепях молекулы IgG.

Молекула полуантитела имеет структуру, образованную одной тяжелой цепью и одной легкой цепью антитела, где тяжелая цепь и легкая цепь могут быть связаны посредством ковалентной связи, или имеет структуру моновалентного антитела, распознающего антиген, которое может быть образовано без ковалентной связи.

Фрагмент Fab представляет собой распознающую молекулу последовательность и фрагмент связывания антигена (Fab) и соответствует двум плечам молекулы антитела, каждое из которых состоит из полной легкой цепи и структурных доменов VH и CH1 тяжелой цепи. scFv представляет собой распознающую молекулу последовательность и является структурным изомером фрагмента антитела, полученного путем генетической модификации варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи антитела. Внеклеточный домен мембранного рецептора является распознающей молекулу последовательностью и мембранный рецептор обычно включает внеклеточную область, которая расположена вне клетки и распознает соответствующий антиген или лиганд и связывается с ним, трансмембранную область которая закрепляет рецептор на поверхности клетки и внутриклеточную область, которая обладает внутриклеточной киназной активностью или сигнальным путем. Лиганд рецептора клеточной мембраны относится к белку, небольшому пептиду или соединению, которое может распознаваться и связываться с внеклеточной областью мембранного рецептора. Цитокины представляют собой низкомолекулярные растворимые белки, которые вырабатываются различными типами клеток, индуцируемых иммуногенами, митогенами или другими стимуляторами, и имеют различные функции, такие как врожденный иммунитет и адаптивный иммунитет, гематопоэз, клеточный рост, полифункциональные клетки APSC (плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма) и восстановление поврежденных тканей и т.д. Цитокины могут быть разделены на интерлейкины, интерфероны, суперсемейства факторов некроза опухолей, колониестимулирующие факторы, хемотаксические факторы (хемокины), факторы роста и т.д. Тэг при экспрессии белка означает аминокислотную последовательность, добавленную на N-конце или C-конце целевого белка, и может представлять собой небольшие пептиды или длинные аминокислоты. Добавление тэга может быть полезным для правильного сворачивания белков, выделения и очистки белка и внутриклеточной деградации белка. Часто используемые тэги могут включать HA, SUMO, His, GST, GFP и Flag, но не ограничены ими.

Не существует ограничений в отношении антител, применимых к гетеродимерному биспецифическому антителу по настоящему изобретению. Антитела, уже используемые в данной области для лечения и/или предупреждения заболеваний, могут быть применены к настоящему изобретению.

Гетеродимерное биспецифическое антитело по настоящему изобретению может иметь одну или более замен, делеций, добавок и/или вставок. Например, несмотря на замены некоторых аминокислот в структуре белка, не происходит значительной потери способности связываться с другими полипептидами (например антигенами) или клетками. Поскольку способность к связыванию и свойства белка определяют биологическую функциональную активность белка, замены некоторых аминокислот в последовательности белка могут не вызывать значительной потери его биологической полезности или активности.

Во многих случаях варианты полипептида могут включать одну или более консервативных замен. "Консервативная замена" означает, что аминокислоты в вариантах полипептида заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичные свойства, так что специалист в области химии пептидов может ожидать, что вторичная структура и гидрофильная природа полипептида будут практически неизменными.

Аминокислотные замены, как правило, могут быть основаны на относительном сходстве свойств заместителей в боковых цепях аминокислот, таких как гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и т.д. Типичные замены, которые учитывают различные характеристики, описанные выше, хорошо известны специалистам в данной области и включают аргинин и лизин; глутаминовую кислоту и аспарагино-

вую кислоту; серин и треонин; глутамин и аспарагин; валин, лейцин и изолейцин.

Используемый здесь термин "идентичность" имеет значение, общеизвестное в данной области, и специалисты в данной области также знакомы с правилами и критериями для определения идентичности разных последовательностей, и идентичность относится к проценту гомологии между остатками варианта полинуклеотидной или полипептидной последовательности и остатками невариантной последовательности после выравнивания этих последовательностей и введения пробелов (при необходимости, для достижения максимального % гомологии). В настоящем раскрытии, при соответствии определению идентичности, также требуется, чтобы полученная последовательность варианта имела биологическую активность, которой обладает родительская последовательность. Способы и средства скрининга вариантов последовательностей с использованием вышеуказанных активностей хорошо известны специалистам в данной области. Такие последовательности вариантов могут быть легко получены специалистами в данной области техники, исходя из приведенной здесь информации. В конкретном воплощении полинуклеотидные и полипептидные варианты имеют по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98%, или по меньшей мере примерно 99%, или по меньшей мере примерно 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичность полинуклеотида или полипептида с полинуклеотидом или полипептидом, описанным здесь. Из-за избыточности генетического кода существуют варианты этих последовательностей, кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность.

В другом аспекте предложена полинуклеотидная композиция, способная гибридизироваться с полинуклеотидной последовательностью, представленной в настоящем описании, или ее фрагментом или комплементарной ей последовательностью в условиях от умеренной до высокой жесткости. Методы гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. В качестве объяснения, подходящие умеренно жесткие условия для тестирования гибридизации полинуклеотида по настоящему изобретению с другим полинуклеотидом могут включать предварительную промывку раствором $5\times\text{SSC}$ (раствор хлорида и цитрата натрия), 0,5% SDS (додецилсульфат натрия), 1,0 mM EDTA (pH 8,0); проведение гибридизации в $5\times\text{SSC}$ при 50°C - 60°C в течение ночи; и двукратную промывку растворами $2\times$, $0,5\times$ и $0,2\times\text{SSC}$, содержащими 0,1% SDS в течение 20 мин при 65°C соответственно. Специалистам в данной области понятно, что жесткостью гибридизации можно легко манипулировать, например путем варьирования содержания соли в растворе для гибридизации и/или температуры гибридизации. Например, в другом воплощении подходящие очень жесткие условия гибридизации могут включать условия, описанные выше, за исключением повышения температуры гибридизации, например до 60°C , до 65°C или до 65°C , до 70°C .

Клетка-хозяин по настоящему изобретению может представлять собой любую клетку, которая может быть использована для экспрессии чужеродного гена, и может включать *E.coli*, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих, без ограничения ими.

Вектор по настоящему изобретению может представлять собой вектор, который может реплицироваться в клетках или организмах любого типа и может включать, например, плазмиды, бактериофаги, космиды и минихромосомы. В одном воплощении вектор, включающий полинуклеотид по настоящему изобретению, представляет собой вектор, подходящий для размножения или репликации полинуклеотида, или вектор, подходящий для экспрессии полипептида по настоящему изобретению. Такие векторы известны в данной области и имеются в продаже.

"Вектор" может включать шаттл-вектор и экспрессионный вектор. Как правило, конструкция плазмиды также может включать точку начала репликации (например точку начала репликации *ColE1*) и селективируемый маркер (например устойчивость к ампициллину и тетрациклину), которые предназначены для репликации и селекции плазмиды в бактериях, соответственно. "Экспрессионный вектор" относится к вектору, включающему контрольную последовательность или регуляторный элемент, который требуется для экспрессии антитела по настоящему изобретению, включая фрагменты антитела, в бактериальных или эукариотических клетках.

Вектор по настоящему изобретению может представлять собой любой вектор, используемый для экспрессии чужеродного гена, и может включать, без ограничения ими, плазмидный вектор, где плазмидный вектор включает, по меньшей мере, точку начала репликации, промотор, интересующий ген, сайт множественного клонирования, селективируемый маркерный ген и вектор по настоящему изобретению может включать, без ограничения ими, плазмидный вектор, полученный на основе pcDNA, например вектор X0GC.

Субъект по настоящему раскрытию может включать птиц, рептилий, млекопитающих и т.д. Млекопитающее может включать грызунов, приматов. Примат может включать человека.

В объем заболеваний, включенных в настоящее раскрытие, могут входить, без ограничения ими, опухоли. Опухоли могут включать лейкоз, лимфому, миелому, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак носоглотки, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак

яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркому матки, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, меланому.

Фармацевтически приемлемые носители означают фармацевтические носители, которые обычно используются в фармацевтике, например разбавители, наполнители, воду и т. д., наполнители, такие как крахмал, сахароза, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза и т. д.; связующие агенты, такие как производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; смачивающие агенты, такие как глицерин; разрыхлители, такие как карбоксиметилкрахмал натрия, гидроксипропилцеллюлоза, кроскармеллоза, агар, карбонат кальция, гидрокарбонат натрия и др.; усилители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; поверхностно-активные вещества, такие как цетанол, лаурилсульфат натрия и т.д.; адсорбционные носители, такие как каолинит, бентонит и т.д.; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция и магния, микронизированный силикагель, полиэтиленгликоль и др. Кроме того, в композицию могут быть добавлены другие добавки, такие как ароматизаторы, подсластители и т.д.

Принцип осуществления изобретения

Ниже настоящее раскрытие будет описано более подробно со ссылкой на следующие неограничивающие примеры. Специалистам в данной области техники понятно, что могут быть внесены различные модификации и изменения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения и эти модификации и изменения также включены в объем настоящего изобретения.

Следующие методы экспериментов являются общераспространенными методами, если не указано иное, и используемые в экспериментах вещества также могут быть легко получены от коммерческих компаний, если не указано иное. Различные антитела, используемые в следующих примерах настоящего описания изобретения, все представляют собой стандартные антитела, приобретенные коммерческим путем.

Пример 1. Конструирование структуры вектора молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

Были сконструированы экспрессионные векторы X0GC, включающие тяжелую цепь и легкую цепь человеческого анти-PD-1(Pem) антитела соответственно. Последовательность варибельной области антитела происходит из <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9798>. Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 9, и его аминокислотная последовательность является такой же, как в SEQ ID NO: 10; нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 3, и его аминокислотная последовательность является такой же, как в SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 11, и его аминокислотная последовательность является такой же, как в SEQ ID NO: 12; нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 13, и его аминокислотная последовательность является такой же, как в SEQ ID NO: 14. Варибельная область легкой цепи и константная область легкой цепи, а также варибельная область тяжелой цепи и константная область тяжелой цепи были амплифицированы с помощью ПЦР. Во всех ПЦР-реакциях из настоящего описания изобретения использовали высокоточную ДНК-полимеразу Phusion (F-530L) от NEB, Inc. Праймеры для ПЦР конструировали обычным образом в соответствии с принципом комплементации оснований и необходимостью сайтов рестрикции ферментами. Условия реакции представляли собой 8,9 мкл H₂O, 4 мкл 5×буфера для высокоточной ДНК-полимеразы Phusion, 4 мкл 1 мМ dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфат), 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера, 0,1 мкл высокоточной ДНК-полимеразы Phusion и 1 мкл матрицы. Продукты ПЦР варибельной области и константной области подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле, и соответствующие им фрагменты извлекали с использованием набора для извлечения ДНК (Promega, A9282, то же самое используется в дальнейшем). Извлеченный фрагмент варибельной области и фрагмент константной области использовали в качестве матриц, и прямой праймер варибельной области и обратный праймер константной области использовали для проведения ПЦР. Соответствующие им фрагменты извлекали с получением полноразмерного фрагмента тяжелой цепи и легкой цепи. Вектор X0GC и полноразмерный фрагмент расщепляли EcoRI (NEB, Кат. № R3101L) и HindIII (NEB, Кат. № R3104L). Условия рестрикции ферментом представляли собой 2 мкл 10×буфера 3, по 0,5 мкл каждого из EcoRI и HindIII, 3 мкл полноразмерного фрагмента, извлеченного из геля, и 14,5 мкл H₂O. Рестрикционным ферментам позволяли осуществлять взаимодействие при 37°C в течение 3 ч. Продукты рестрикции лигировали с использованием лигазы T4DNA (NEB, Кат. № M0202V) (то же самое используется в дальнейшем), и условия реакции представляли собой 2 мкл 10× лигазного буфера, 0,5 мкл лигазы, 3 мкл полноразмерного фрагмента, извлеченного из геля, 3 мкл вектора X0GC, извлеченного из геля, и 11,5 мкл H₂O, которые были подвергнуты лигированию при комнатной температуре в течение 12 ч. Продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки E.coli DH5α (Tiangen, CB104, то же самое используется в дальнейшем). Экспрессионные векторы X0GC тяжелой и легкой цепи антитела получали для того, чтобы экспрессировать тяжелую цепь и легкую цепь антитела в эукариотических клетках соответственно.

В настоящем изобретении также были сконструированы другие экспрессионные векторы X0GC,

включающие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против человеческого PD-1(BJHM), соответственно. Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 15, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 16; нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 3, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 17, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 18; нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 13, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 14. Экспрессионные векторы X0GC тяжелой и легкой цепи антитела были получены для экспрессии тяжелой и легкой цепи антитела в эукариотических клетках соответственно.

В настоящем изобретении также были сконструированы экспрессионные векторы X0GC, включающие тяжелую и легкую цепь антитела против человеческого HER2, соответственно. Последовательность варибельной области антитела происходит из <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>, и константная область тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG1(Fc₂). Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 1, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 2; нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 3, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 4; нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 5, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 6; нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи является такой же, как в SEQ ID NO: 7, и его аминокислотная последовательность такая же, как в SEQ ID NO: 8. Экспрессионные векторы X0GC тяжелой и легкой цепи антитела были получены для экспрессии тяжелой и легкой цепи антитела в эукариотических клетках соответственно.

Пример 2. Экспрессия молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

Экспрессионные векторы, включающие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против человеческого PD-1 трансфицировали в клетки 293F (FreeStyle™ 293-F Cells, Кат. № R79007, Invitrogen), соответственно, и экспрессионные векторы, включающие тяжелую и легкую цепь антитела против человеческого HER2, также трансфицировали в клетки 293F соответственно. За день до трансфекции клетки высевали. В день трансфекции клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в свежей экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (Кат. № 12338001, Gibco) с плотностью клеток 200-10 клеток/мл. Плазмиду добавляли в соответствии с объемом трансфекции, и, когда конечная концентрация составляла 36,67 мкг/мл, осуществляли легкое однородное перемешивание. Затем добавляли линейный полиэтиленимин (PEI, линейный, ММ 25000, кат. № 43896, Alfa Aesar), и когда конечная концентрация составляла 55 мкг/мл, выполняли легкое однородное перемешивание. Затем смесь помещали в инкубатор и инкубировали при встряхивании со скоростью 120 об/мин при 37°C в течение 1 ч. Затем туда добавляли 19-кратный по сравнению с объемом трансфекции объем свежей среды. Инкубацию непрерывно проводили при встряхивании со скоростью 120 об/мин при 37°C. Культуральные супернатанты трансфицированных клеток, инкубированных в течение 5-6 суток, собирали центрифугированием.

Уровень экспрессии определяли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Перед очисткой путем нанесения культурального супернатанта на хроматографическую колонку осадок удаляли фильтрованием через фильтр 0,2 мкм. Эту процедуру выполняли при 4°C.

Пример 3. Очистка продукта экспрессии молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

Очистку проводили при 4°C, используя систему очистки белка типа АКТА explorer 100 (GE Healthcare) и аффинную хроматографию rProtein A Sepharose Fast Flow (16 мм внутр. диам., 22 мл, GE Healthcare). Сначала для уравнивания хроматографической колонки использовали подвижную фазу А (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,4). После того, как исходный уровень стабилизировался, загружали супернатант вышеуказанных обработанных клеток со скоростью потока 5 мл/мин. После загрузки образца проводили уравнивание с использованием подвижной фазы А. Образец представлял собой продукт экспрессии анти-PD-1 и продукт экспрессии анти-HER2 соответственно. Затем подвижную фазу В1 (подвижная фаза А, содержащая 0,5 М аргинина) использовали для элюирования 5 объемов колонки; 5 объемов колонки промывали подвижной фазой В2 (100 мМ лимонной кислоты, pH 3,0) для сбора пика элюирования, то есть пика интересующего белка; скорость потока при промывании составляла 5 мл/мин. Хроматограмма пика элюирования анти-PD-1-Fc1 показана на фиг. 1, а пик элюирования анти-HER2-Fc2 также являлся аналогичным (результат не показан). Собирали указанный пик элюирования (показана серая область) и pH доводили до 5,0 путем добавления по каплям 1 М раствора ацетата натрия.

Пример 4. Очистка молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

Структура молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела показана на фиг. 2.

Продукты экспрессии анти-PD-1 и анти-HER2, полученные описанным выше методом rProtein A Sepharose Fast Flow (16 мм внутр. диам., 22 мл, GE Healthcare), были подвергнуты рекомбинации in vitro с получением гетеродимера. Сначала очищенные и собранные белковые растворы концентрировали ульт-

рафильтрацией с помощью концентрирующей пробирки для ультрафильтрации (отсечка по номинальной молекулярной массе 10 кДа) и раствор заменяли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (pH=7,4). Полученные анти-PD-1 и анти-HER2 продукты экспрессии доводили до 1 мг/мл добавлением PBS, а 1/200 кратную часть конечного объема 1 M DTT (дителиотреитол) добавляли таким образом, чтобы конечная концентрация DTT составляла 5 mM соответственно. Восстановление осуществляли при 4°C (от 3 до 8 ч) и дисульфидные связи открывали посредством процесса восстановления и дисульфидные связи шарнирной области небольшого количества молекул гомодимера антител, содержащихся в анти-PD-1 и анти-HER2 продуктах экспрессии, также открывали, тем самым образуя молекулу полуантитела, содержащую одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, структуры которых показаны на фиг. 3. Восстановленный образец анализировали методом SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография) с содержанием 1 mM восстановителя DTT в буфере подвижной фазы. Результаты показаны на фиг. 4. Массовое соотношение анти-PD-1 и анти-HER2 гомодимеров составляло менее 10%. В соответствии с этим массовое соотношение массы молекул полуантител составляло более 90%.

Затем восстановленные молекулы анти-PD-1 и анти-HER2 полуантител смешивали в соответствии с молярным соотношением, и реакцию рекомбинации проводили при 4°C в течение 24 ч. Во время рекомбинации гетеродимерное биспецифическое антитело, включающее молекулы и анти-PD-1, и анти-HER2 полуантител образовалось посредством нековалентного взаимодействия между CH₂ и CH₃ молекул анти-PD-1 и анти-HER2 полуантител. Затем раствор белка концентрировали ультрафильтрацией через концентрирующую пробирку для ультрафильтрации (номинальная молекулярная масса отсечки составляла 10 кДа) и раствор заменяли PBS (pH=7,4) для прекращения восстановления. Раствор подвергали окислению на воздухе или с помощью окислителя для образования дисульфидных связей гетеродимерного биспецифического антитела. Условия окисления были следующими. Добавляли 100 mM L-дегидроаскорбиновую кислоту в качестве окислителя, и, когда конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл и конечная концентрация окислителя составляла 1 mM, проводили окисление при 4°C в течение 24 ч. Образец, полученный посредством вышеописанного окисления, подвергали анализу SDS-PAGE, и результаты показаны на фиг. 5.

Молекулы гетеродимера, полученные при помощи вышеописанного восстановления/окисления анти-PD-1 и анти-HER2 полуантител, концентрировали ультрафильтрацией через концентрирующую пробирку для ультрафильтрации (номинальная молекулярная масса отсечки составляла 10 кДа) и раствор заменяли натрий-фосфатным буферным раствором (pH=5,8). Очистку проводили при 4°C, используя систему очистки белка типа AKTA explorer 100 (GE Healthcare) и колонку для ионной хроматографии Source 15S (16 мм внутр. диам., 17 мл, GE Healthcare). Сначала для уравнивания хроматографической колонки использовали подвижную фазу A (10 mM фосфата натрия, pH 7,0). После того, как исходный уровень стабилизировался, обработанный выше раствор белка загружали со скоростью потока 3 мл/мин. После загрузки образца проводили уравнивание с использованием подвижной фазы A. После этого 20 объемов колонки (0% B-100% B, 170 мин, скорость потока 2 мл/мин) промывали градиентом от A (10 mM фосфат натрия, pH 5,8) до B (10 mM фосфат натрия, pH 5,8). Указанный основной пик элюирования собирали (см. фиг. 6), и собранный белковый раствор концентрировали ультрафильтрацией через концентрирующую пробирку для ультрафильтрации (отсечка номинальной молекулярной массы составляла 10 кДа). Раствор заменяли фосфатным раствором (PBS, pH=7,4), фильтровали и стерилизовали, а затем хранили при 4°C. Очищенный продукт анализировали методом SDS-PAGE, и результаты показаны на фиг. 7. По результатам анализа чистоты посредством SEC-HPLC, чистота составляла 97,3% (фиг. 8).

Пример 5. Стабильность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

10 мг/мл полностью герметично закрытых образцов PD-1/HER2 гетеродимера оставляли в камере с постоянным климатом (BINDER KBF240) при 40°C и отбирали по 20 мкг образца в соответствующие моменты времени (исходный уровень (сутки 0), через 1 сутки, 3 суток, 5 суток, 7 суток и 14 суток) и разделяли посредством метода эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC). Условия вышеуказанной SEC-HPLC были следующими:

- (1) Колонка для эксклюзионной хроматографии: TSKgel G3000SW×1 (Tosoh Bioscience), 5 мкм, 7,8 мм × 30 см;
- (2) Мобильная фаза: 5 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 6,7;
- (3) Скорость потока: 0,6 мл/мин;
- (4) Длина волны УФ-детектирования: 280 нм;
- (5) Время сбора: 30 мин.

Используемый прибор представлял собой Agilent 1200 Infinity chromatography, и хроматограмму регистрировали с использованием Agilent ChemStation и рассчитывали соотношение оставшихся мономеров. Как показано на фиг. 9 (10 мг/мл) и 10 (1 мг/мл) димер не подвергался значительной агрегации в условиях эксперимента при 40°C, и поэтому считали, что гетеродимер PD-1/HER2 обладает превосходной термостабильностью.

Пример 6. In vitro связывающая активность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного анти-

тела

Связывающую способность гетеродимерного антитела PD-1/HER2 в отношении одного антигена определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA).

Подробная процедура заключалась в следующем: рекомбинантный человеческий PD-1 (Beijing Yiqiao Shenzhou, кат. № 10377-H08H) или человеческий HER2 (Beijing Yiyi) наносили в виде покрытия на 96-луночный планшет для ELISA с высокой адсорбцией, используя карбонатный буферный раствор с pH 9,6, с концентрацией покрытия 1 мкг/мл и количеством покрытия 100 мкл на лунку. Покрытие выполняли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз. Планшет блокировали с помощью 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, инкубировали в течение 1 ч при 25°C и промывали PBST пять раз. Образец гетеродимерного антитела и контрольный образец, серийно разбавленные PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем меченные пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, кат. № AP309P), разведенные 1: 2000 PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Колориметрический ТМБ (3,3",5,5"-тетраметилбензидиновый) субстрат добавляли в количестве 100 мкл/лунку и проявляли в течение 10 мин при комнатной температуре. Развитие окраски прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Абсорбцию при 450 нм определяли на считывающем устройстве для микропланшетов.

В результате, как показано на фиг. 11, все анти-PD-1_{рем}/анти-HER2 и анти-PD-1_{ВНМ}/анти-HER2 имели высокую аффинность к PD-1 и HER2, и антигенная аффинная активность двухвалентного моноклонального антитела относительно хорошо сохранялась. Среди них анти-PD-1_{ВНМ}/анти-HER2 обладал более сильной аффинностью к PD-1, чем анти-PD-1_{рем}/анти-HER2.

Пример 7. Одновременная связывающая активность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела в отношении двух антигенов-мишеней

Одновременную связывающую способность PD-1/HER2 гетеродимерного антитела в отношении двух антигенов-мишеней определяли на PD-1-сверхэкспрессирующих клетках CHO/PD-1 (GenScript, Кат. №. M00529) и на HER2-сверхэкспрессирующих клетках SK-BR-3 с помощью проточной цитометрии (FACS).

Клетки CHO/PD-1 окрашивали в соответствии с инструкциями к набору PKH26 (Sigma, кат. № SLBN4568V). В кратком изложении, клетки CHO/PD-1 собирали и один раз промывали бессывороточной средой. Клетки CHO/PD-1 готовили в виде клеточной суспензии 2×10⁷/мл с использованием разбавителя С из набора PKH26. Краситель PKH26 разбавляли до 4 мкМ. Затем их смешивали в соотношении 1:1. Смешанная суспензия имела плотность клеток 1×10⁷/мл и концентрацию PKH26 2 мкМ, и ее инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем инкубировали с равным объемом FBS в течение 1 мин с последующим прекращением окрашивания. Суспензию центрифугировали при 400g в течение 10 мин, дважды промывали полной средой и ресуспендировали в полной среде для последующего использования. Клетки SK-BR-3 окрашивали в соответствии с инструкциями к набору CFSE (Life technology, Кат. №. C34554). В кратком изложении, CFSE разбавляли PBS до рабочей концентрации 0,5 мкМ и предварительно нагревали до 37°C. Клетки SK-BR-3 собирали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в предварительно нагретом рабочем растворе CFSE с последующей инкубацией при 37°C в течение 15 мин. Клетки SK-BR-3 собирали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в полной среде с последующей инкубацией в течение 30 мин. Клетки один раз промывали полной средой и ресуспендировали в полной среде для последующего использования.

Окрашенные выше клетки собирали центрифугированием и один раз промывали холодным PBS, содержащим 2% FBS. Клетки ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 2% FBS, при плотности клеток 5×10⁶/мл. SK-BR-3 и CHO/PD-1 смешивали в соотношении 1:1, а затем отбирали по 100 мкл из каждой пробирки (то есть 2,5×10⁵ SK-BR-3 и 2,5×10⁵ CHO/PD-1). Затем 100 мкл образцов гетеродимерных антител, разведенных холодным PBS, содержащим 2% FBS, контрольную группу и изотипический контроль (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi Voya Biopharmaceutical Co., Ltd., национальное разрешение использования № S19993012), добавляли в конечной концентрации 5 нМ, соответственно. Пробирку инкубировали на льду в течение 30 мин и дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS.

В результате, как показано в табл. 1 и на фиг. 12, наблюдалось одновременное связывание гетеродимерного антитела и с PD-1-сверхэкспрессирующими клетками CHO/PD-1, и с HER2-сверхэкспрессирующими клетками SK-BR-3, что позволяет предположить, что гетеродимерное антитело PD-1/HER2 способно инициировать тесную ассоциацию между клетками SK-BR-3 и CHO/PD-1, которая является основой для опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток.

Таблица 1. Процент клеток, инициирующих тесную ассоциацию

Название образца	% ассоциированных клеток
Изотипический контроль	1,89
HER2 моноклональное антитело (100нМ)	1,39
PD-1 моноклональное антитело _{рем} (100нМ)	1,26
PD-1 моноклональное антитело _{внм} (100нМ)	1,43
PD-1 моноклональное антитело+HER2 моноклональное антитело(100нМ)	1,45
анти-PD-1 _{рем} /анти-HER2 (100нМ)	39,71
анти-PD-1 _{внм} /анти-HER2 (0,1нМ)	8,15
анти-PD-1 _{внм} /анти-HER2 (1нМ)	32,79
анти-PD-1 _{внм} /анти-HER2 (10нМ)	36,00
анти-PD-1 _{внм} /анти-HER2 (100нМ)	38,12

Пример 8. Блокирующая активность молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела против связывания PD-1 с лигандом PD-L1 или PD-L2

Рекомбинантный человеческий PD-1-Fc наносили в виде покрытия на 96-луночный планшет для ELISA с высокой адсорбцией, используя раствор фосфатного буфера с pH 9,6 при концентрации покрытия 1 мкг/мл и количестве покрытия 100 мкл на лунку, и выполняли покрытие при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз. Планшет блокировали 300 мкл/лунку PBST, содержащим 1% BSA, инкубировали в течение 1 ч при 25°C и промывали PBST пять раз. Добавляли образец гетеродимерного антитела и контроль, каждый из которых был серийно разбавлен PBST, содержащим 1% BSA, с одновременным добавлением меченого биотином PD-L1-Fc в конечной концентрации 1 мкг/мл, или меченого биотином PD-L2 в конечной концентрации 4 мкг/мл, в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченный пероксидазой хрена стрептавидин (BD, кат. № 554066), разведенный 1:1000 PBST, содержащим 1% BSA, в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Колориметрический субстрат TMB добавляли в количестве 100 мкл/лунку и проявляли в течение 10 мин при комнатной температуре. Развитие окраски прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1M H₂SO₄. Абсорбцию при 450 нм определяли на считывающем устройстве для микропланшетов.

В результате, как показано на фиг. 13, анти-PD-1_{рем}/анти-HER2 и анти-PD-1_{внм}/анти-HER2 оба обладают блокирующей активностью против PD-1/PD-L1 и PD-1/PD-L2 связывания, и блокирующая активность двухвалентного моноклонального антитела относительно хорошо сохранялась. Среди них, анти-PD-1_{внм}/анти-HER2 обладает более сильной PD-1 блокирующей активностью, чем PD-1_{рем}/анти-HER2.

Пример 9. Активность усиления Т-клеточной секреции цитокинов молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела

Собирали человеческие клетки PBMC (Lonza, Кат. № CC-2702). Человеческие клетки PBMC ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) при плотности клеток 2×10^6 /мл, и 100 мкл/лунка (2×10^5 клеток на лунку) клеток вносили в 96-луночные планшеты. Образец PD-1/HER2 гетеродимерного антитела и контрольный образец, разбавленный полной средой, добавляли в количестве 50 мкл на лунку. РНА (агглютинин *Phaseolus vulgaris*) (Sigma, кат. № L-2769), разбавленный полной средой в конечной концентрации 1 мкг/мл, добавляли в количестве 50 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе с диоксидом углерода при 37°C. Через 3 суток инкубации отбирали 50 мкл супернатанта и использовали для обнаружения цитокина IL-2 (Ray Biotech, Кат. № ELH-IL2).

Как показано на фиг. 14, человеческие Т-клетки активируют секрецию IL-2 при РНА-стимуляции. Добавление PD-1-антитела усиливает активацию Т-клеток и стимулирует секрецию цитокинов, в то время как PD-1/HER2 гетеродимерное антитело обладает эффектом, подобным моноклональному антителу PD-1, и стимулирует секрецию цитокина IL-2 зависимым от концентрации образом.

Пример 10. Фармакокинетика молекулы анти-PD-1/анти-HER2 гетеродимерного антитела у крыс

Для экспериментов использовали самое крыс SD в возрасте 6-8 недель, приобретенные у Beijing Huafukang Biotechnology. Через одну неделю после того, как крысы акклиматизировались к окружающей среде, их рандомизировали в группы, каждая из которых содержала 3 крысы. Каждой группе внутривенно один раз вводили моноклональное PD-1-антитело, моноклональное HER2-антитело, гетеродимерное PD-1/HER2-антитело в дозе 20 нмоль/кг. Сразу после введения, через 5 мин, 30 мин, 1 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч, 168 ч, 216 ч, 264 ч, 312 ч, 360 ч, 408 ч и 480 ч после введения из века отбирали от 0,2 до 0,3 мл крови. Образцы крови оставляли при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч без использования антикоагулянта, и после коагуляции образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученные образцы сыворотки замораживали и хранили при -80°C до тестирования.

Сывороточные концентрации моноклонального PD-1-антитела, моноклонального HER2-антитела и PD-1/HER2-гетеродимерного антитела были определены с помощью ELISA. В кратком изложении, рекомбинантный белок HER2 человека (Beijing Yiqiao Shenzhen, кат. № 10004-H08H) или рекомбинантный

белок PD-1 (Beijing Yiqiao Shenzhou, кат. № 10377-H08H) наносили в виде покрытия на планшет для ELISA с высокой адсорбцией на ночь с использованием карбонатного буферного раствора pH 9,6 при 4°C. Планшеты промывали PBST. Для предупреждения неспецифического связывания планшеты блокировали PBST, содержащим 5% обезжиренного молока, и промывали PBST. Затем добавляли 10% смешанную сыворотку крысы и образец исследуемой сыворотки, разведенный PBST, содержащим 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч, и планшеты промывали PBST. Добавляли меченное пероксидазой хрена антитело против IgG человека (Chemicon, кат. № AP309P), разведенное PBST, содержащим 5% обезжиренного молока, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшеты промывали PBST. Наконец, осуществляли цветное проявление с использованием колориметрического субстрата ТМВ в течение 10 мин при комнатной температуре. Развитие окраски прекращали добавлением 1 М H₂SO₄. Абсорбцию при 450 нм считывали на считывающем устройстве для микропланшетов.

В результате, как показано на фиг. 15, 20 нмоль/кг гетеродимерного PD-1/HER2 антитела, которое использовали в однократной внутривенной инъекции, показали хорошие фармакокинетические характеристики у крыс. Фармакокинетические параметры гетеродимерного анти-PD-1_{ВЛНМ}/анти-HER2 антитела являются следующими: время полужизни (t_{1/2}) составляло 207 ч; площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме от времени (AUC_{last}) составляла 33448 нМч; C₀ составляла 534 нМ; наблюдаемый объем распределения (V_d) составлял 148 мл/кг; клиренс (CL) составлял 0,50 мл/час/кг; и среднее время удерживания (MRT_{last}) составляло 159 ч.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерное биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий функциональный домен, способный специфически связываться с PD-1, и второй антигенсвязывающий функциональный домен, способный специфически связываться с HER2, где гетеродимерное биспецифическое антитело содержит первую цепь Fc и вторую цепь Fc, которые соединены друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей, где первая цепь Fc и вторая цепь Fc соответственно соединены с антигенсвязывающим функциональным доменом PD-1 и антигенсвязывающим функциональным доменом HER2 посредством ковалентной связи или линкера, или первая цепь Fc и вторая цепь Fc соответственно соединены с антигенсвязывающим функциональным доменом HER2 и антигенсвязывающим функциональным доменом PD-1 посредством ковалентной связи или линкера, и первая цепь Fc и вторая цепь Fc содержат 5 аминокислотных замен в следующих положениях:

аминокислотные замены в положениях T366 и D399 первой цепи Fc и аминокислотные замены в положениях L351, Y407 и K409 второй цепи Fc;

где аминокислотные замены первой цепи Fc представляют собой T366L и D399R, а аминокислотные замены второй цепи Fc представляют собой L351E, Y407L и K409V,

где положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat EU.

2. Гетеродимерное биспецифическое антитело по п.1, где цепь Fc происходит из IgG.

3. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1 или 2, где антигенсвязывающие функциональные домены PD-1 и HER2 представляют собой Fab-фрагменты или scFv-фрагменты.

4. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-3, где все антигенсвязывающие функциональные домены PD-1 и HER2 представляют собой Fab-фрагменты.

5. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-3, где один из антигенсвязывающих функциональных доменов PD-1 и HER2 представляет собой Fab-фрагмент, а другой представляет собой scFv-фрагмент.

6. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.3-5, где Fab-фрагмент содержит первую переменную область тяжелой цепи и вторую переменную область тяжелой цепи, которые отличаются друг от друга, а также первую переменную область легкой цепи и вторую переменную область легкой цепи, которые отличаются друг от друга.

7. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-6, где, когда каждая из первой цепи Fc, ковалентно связанной с антигенсвязывающим функциональным доменом PD-1, и второй цепи Fc, ковалентно связанной с антигенсвязывающим функциональным доменом HER2, или каждая из первой цепи Fc, ковалентно связанной с антигенсвязывающим функциональным доменом HER2, и второй цепи Fc, ковалентно связанной с антигенсвязывающим функциональным доменом PD-1, присутствует отдельно в присутствии восстановителя, массовое соотношение составных гомодимеров составляет менее 50%.

8. Гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где аминокислотная последовательность биспецифического антитела содержит по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18.

9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-8.

10. Выделенный полинуклеотид по п.9, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17.

11. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п.9 или 10.

12. Рекombинантный экспрессионный вектор по п.11, представляющий собой плазмидный вектор X0GC, полученный путем модификации pcDNA.

13. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.9 или 10 или рекombинантный экспрессионный вектор по п.11 или 12.

14. Клетка-хозяин по п.13, которая выбрана из эмбриональной клетки почки человека НЕК293 или НЕК293Т, НЕК293Е или НЕК293F, полученных из клетки НЕК293; и клетки яичника китайского хомяка СНО или СНО-S, СНО-dhfr-, СНО/DG44 или ExpiСНО, происходящих из клетки СНО.

15. Композиция для профилактики или лечения злокачественного заболевания, содержащая гетеродимерное биспецифическое антитело по любому из пп.1-8, выделенный полинуклеотид по п.9 или 10, рекombинантный экспрессионный вектор по п.11 или 12 или клетку-хозяина по п.13 или 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Композиция по п.15, где злокачественное заболевание выбрано из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака и меланомы.

17. Способ получения гетеродимерного биспецифического антитела по любому из пп.1-8, включающий:

1) экспрессию выделенного полинуклеотида по п.9 или 10 или рекombинантного экспрессионного вектора по п.11 или 12 в клетке-хозяине;

2) очистку и восстановление каждого белка, экспрессируемого в клетке-хозяине; и

3) смешивание восстановленных белков и последующее окисление смеси.

18. Способ по п.17, где клетка-хозяин выбрана из эмбриональной клетки почки человека НЕК293 или НЕК293Т, НЕК293F или НЕК293Е, происходящих из клетки НЕК293; и клетки яичника китайского хомяка СНО или СНО-S, СНО-dhfr-, СНО/DG44 или ExpiСНО, происходящих из клетки СНО.

19. Способ по п.17 или 18, где восстановление включает:

1) добавление восстановителя, выбранного из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбокситил)фосфина, других химических производных и их комбинации,

2) проведение реакции восстановления в присутствии дитиотреитола в концентрации 0,1 мМ или более при 4°C в течение 3 ч и

3) удаление восстановителя путем обессоливания и т.д.

20. Способ по любому из пп.17-19, где окисление включает:

1) окисление на воздухе или при добавлении окислителя, причем окислитель выбран из L-дегидроаскорбиновой кислоты и других химических производных, и

2) проведение реакции окисления в присутствии L-дегидроаскорбиновой кислоты в концентрации 0,5 мМ или более при 4°C в течение 5 ч.

21. Способ по любому из пп.17-20, дополнительно включающий выделение и очистку.

22. Применение гетеродимерного биспецифического антитела по любому из пп.1-8, или выделенного полинуклеотида по п.9 или 10, или рекombинантного экспрессионного вектора по п.11 или 12, или клетки-хозяина по п.13 или 14, или композиции по п.15 или 16 в изготовлении лекарственного средства для профилактики или лечения злокачественного заболевания у субъекта.

23. Применение гетеродимерного биспецифического антитела по любому из пп.1-8, или выделенного полинуклеотида по п.9 или 10, или рекombинантного экспрессионного вектора по п.11 или 12, или клетки-хозяина по п.13 или 14, или композиции по п.15 или 16 для профилактики или лечения злокачественного заболевания у субъекта.

24. Применение по п.22 или 23, где злокачественное заболевание выбрано из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака и меланомы.

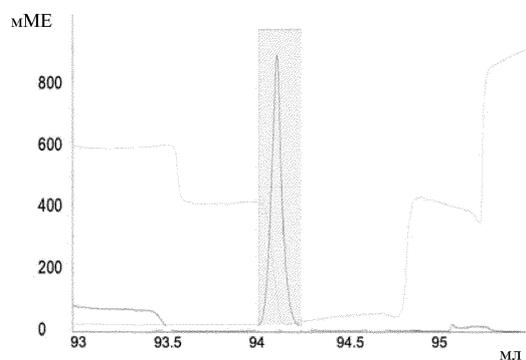
25. Способ предупреждения или лечения злокачественного заболевания, включающий введение гетеродимерного биспецифического антитела по любому из пп.1-8, или выделенного полинуклеотида по п.9 или п.10, или рекombинантного экспрессионного вектора по п.11 или п.12, или клетки-хозяина по п.13 или п.14, или композиции по п.15 или п.16 субъекту, нуждающемуся в этом.

26. Способ по п.25, где злокачественное заболевание выбрано из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, мелкоклеточного рака легкого, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия,

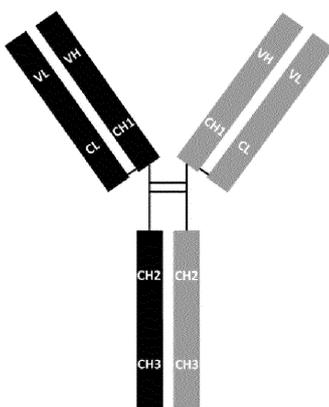
саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака и меланомы.

27. Применение по любому из пп.22-24, где субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.

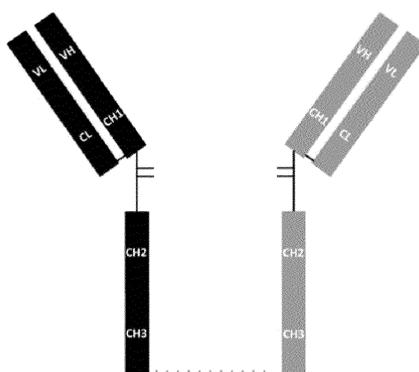
28. Способ по п.25 или 26, где субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.



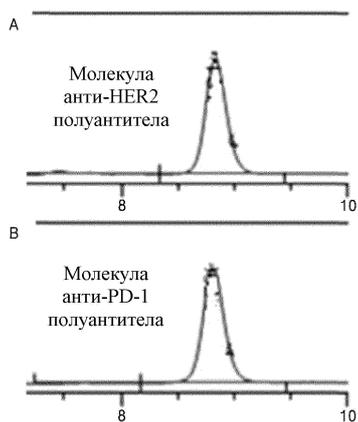
Фиг. 1



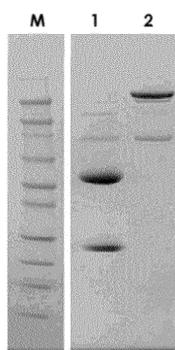
Фиг. 2



Фиг. 3

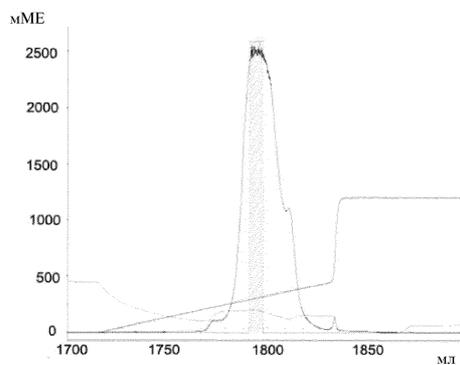


Фиг. 4

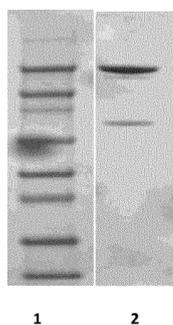


1 - Смесь молекул анти-HER2 и анти-PD-1 полуантител
 2 - Смесь молекул анти-HER2 и анти-PD-1 полуантител после окисления
 3 - Маркер молекулярной массы

Фиг. 5



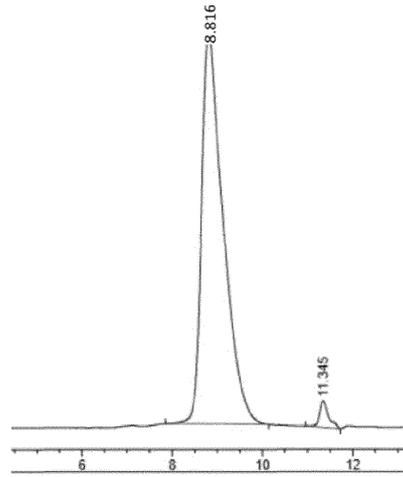
Фиг. 6



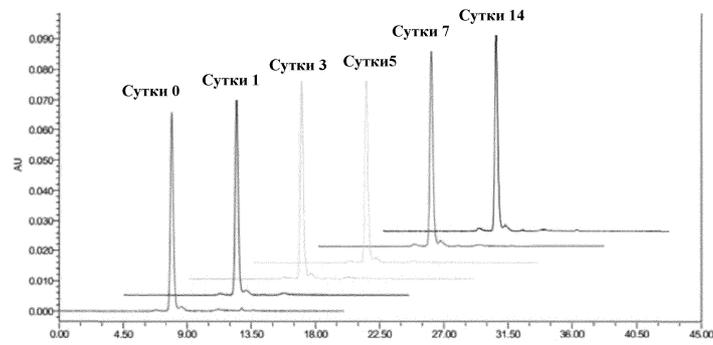
1 - Маркер молекулярной массы
 2 - Очищенная молекула гетеродимерного антитела

Фиг. 7

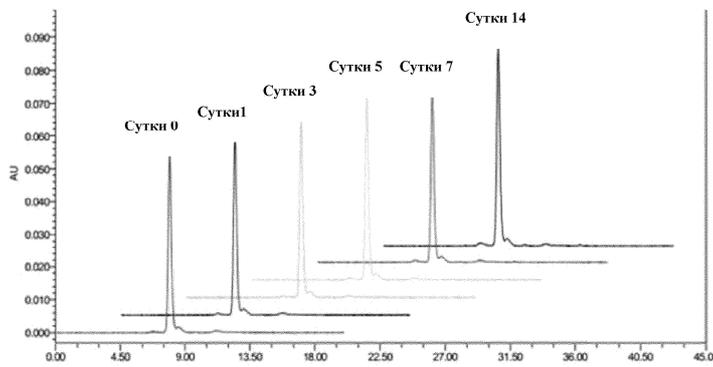
043006



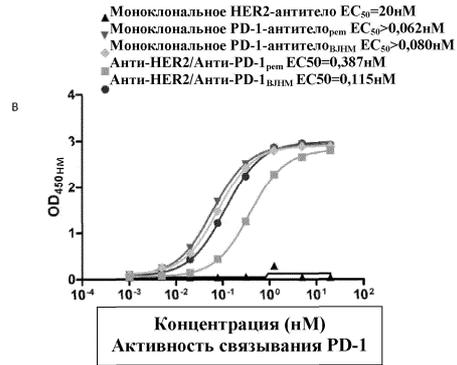
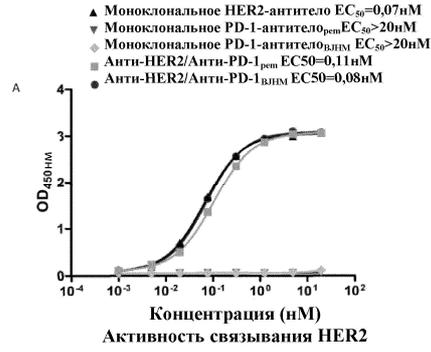
Фиг. 8



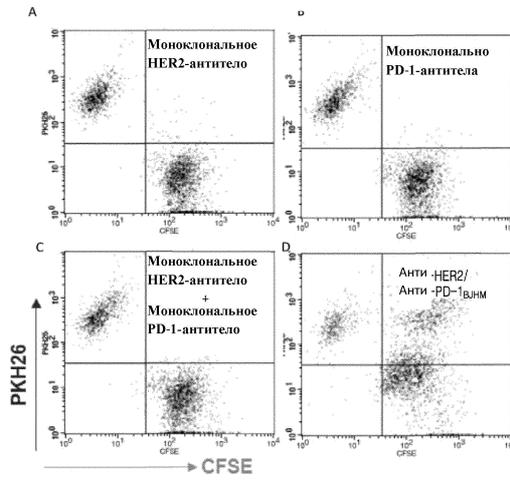
Фиг. 9



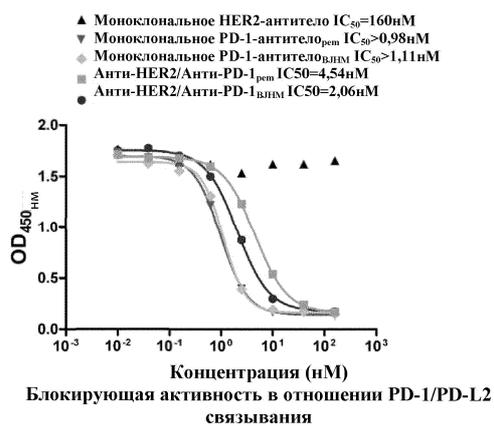
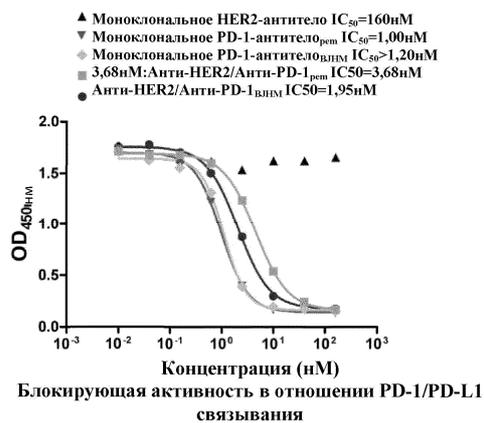
Фиг. 10



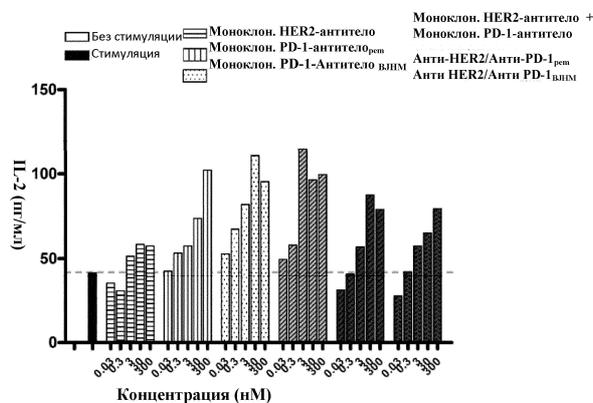
Фиг. 11



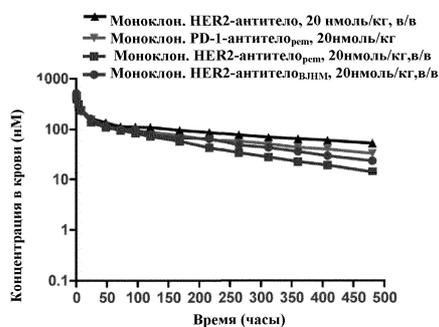
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

