(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291370 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(22) Дата подачи заявки
2020.11.25

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

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

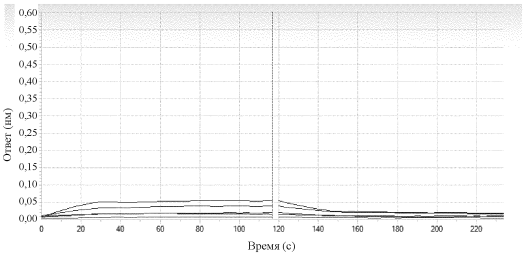
(31) **201911164156.2**
(32) **2019.11.25**
(33) **CN**
(86) **PCT/CN2020/131447**
(87) **WO 2021/104302 2021.06.03**

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

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

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

(57) Предложены биспецифическое антитело против VEGFA и против PD-1 и его применение. Конкретно, биспецифическое антитело против VEGFA и против PD-1 содержит первую белковую функциональную область, направленную на PD-1, и вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA. Согласно системе нумерации EU в двух положениях из положений 234 и 235 константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, входящего в состав биспецифического антитела, происходит мутация, и после мутации константа аффинности биспецифического антитела в отношении FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или C1q снижена по сравнению с соответствующей константой до мутации. Биспецифическое антитело может специфично связываться с VEGFA и PD-1, специфично уменьшать иммуносупрессивное действие VEGFA и PD-1 на организм и ингибировать опухоль-индуцированный ангиогенез и, таким образом, имеет хорошие перспективы применения.



202291370 A1

202291370 A1

PCT/CN2020/131447

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

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 И ПРОТИВ VEGFA, ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение принадлежит к области лечения опухолей и иммунобиологии и относится к биспецифическому антителу против PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1-го типа) и против VEGFA (фактор роста эндотелия сосудов A), его фармацевтической композиции и его применению. Конкретно, настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу против человеческого PD-1 и против человеческого VEGFA, его фармацевтической композиции и его применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

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

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

Молекулы семейства VEGF имеют разную аффинность в отношении этих рецепторов. VEGFA действует главным образом в комбинации с VEGFR1, VEGFR2 и NRP-1. VEGFR1 был обнаружен раньше других рецепторов и в обычных физиологических условиях имеет более высокую аффинность в отношении VEGFA, чем VEGFR2, но тирозиназная активность внутриклеточного сегмента у него ниже, чем у

VEGFR2 (Ma Li, Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 2016, 24 (5): 146-148).

VEGFR2 является основным регулятором ангиогенеза и развития сосудов и имеет более высокую тирозинкиназную активность, чем VEGFR1. VEGFR2, после связывания с лигандом VEGFA, опосредует пролиферацию, дифференцировку и сходные с ними процессы в эндотелиальных клетках сосудов, а также процесс образования кровеносных сосудов и проницаемость кровеносных сосудов (Roskoski R Jr. *et al.*, Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 62(3): 179-213). VEGFA, после связывания с VEGFR2, опосредует транскрипционную экспрессию генов связанных с ним внутриклеточных белков через последующий сигнальный путь PLC-γ-PKC-Raf-MEK-MAPK и посредством этого стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов (Takahashi T *et al.*, Oncogene, 1999, 18(13): 2221-2230).

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

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

В настоящее время есть несколько гуманизированных моноклональных антител, направленных на человеческий VEGF, в частности VEGFA, такие как бевацизумаб, который в 2004 г. был последовательно одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для лечения различных

опухолей, таких как немелкоклеточный рак легкого, почечноклеточный рак, рак шейки матки и метастатический колоректальный рак.

Рецептор программируемой клеточной гибели 1-го типа (PD-1), также известный как CD279, представляет собой мембранный поверхностный рецептор, являющийся трансмембранным гликопротеином I-го типа, принадлежащим к иммуноглобулиновому суперсемейству CD28, и обычно экспрессирован в Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. У PD-1 есть два естественных лиганда, PD-L1 и PD-L2. Как PD-L1, так и PD-L2 принадлежат к суперсемейству B7 и экспрессированы, конститутивным или индуцируемым образом, на поверхности мембраны множества клеток, включая некроветворные клетки и множество опухолевых клеток. PD-L1 экспрессирован главным образом на Т-клетках, В-клетках, DC (дендритных клетках), эндотелиальных клетках микрососудов и множестве опухолевых клеток, в то время как PD-L2 экспрессирован только на антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги. Взаимодействие между PD-1 и его лигандами может ингибировать активацию лимфоцитов, пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов, таких как IL-2 (интерлейкин 2) и IFN-γ (интерферон гамма).

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

Кроме того, антитела против PD-1 могут также быть использованы в лечении

хронических вирусных инфекций. Хронические вирусные инфекции часто сопровождаются снижением функции вирус-специфичных эффекторных Т-клеток и уменьшением их количества. Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 может быть заблокировано введением антитела к PD-1, что приводит к эффективному ингибированию истощения эффекторных Т-клеток при хронической вирусной инфекции.

Ввиду широкого противоопухолевого спектра и неожиданной эффективности антител к PD-1, в данной области принято считать, что антитела, направленные на путь PD-1, приведут к прорывам в лечении множества опухолей: немелкоклеточного рака легкого, почечноклеточного рака, рака яичника и меланомы (Homet M. B., Parisi G., *et al.*, Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol., Jun. 2015, 42 (3): 466-473), лимфомы и анемии (Held SA, Heine A, *et al.*, Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets., Sep. 2013, 13 (7): 768-74), опухолей с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR)(несколько лекарственных средств с антителами против PD-1 были одобрены FDA *et al.* для лечения опухолей с признаками MSI-H/dMMR).

Применяемое в настоящее время сочетание антиангиогенной терапии и ингибиторов иммунных контрольных точек демонстрирует хорошую эффективность при многих опухолях. Например, комбинация антител против VEGF (таких как бевацизумаб) и антител к PD-1/PD-L1 (таких как ниволумаб, пембролизумаб и атезолизумаб) для применения в лечении рака яичника (Joyce F. Liu *et al.*, JAMA Oncol., 2019; 5(12): 1731-1738), немелкоклеточного рака легкого (немелкоклеточного рака легкого, включая EGFR(рецептор эпидермального фактора роста)- и/или ALK(киназа анапластической лимфомы)-чувствительные мутации) (Manegold C, *et al.*, J Thorac Oncol., Feb. 2017; 12(2): 194-207), почечноклеточного рака (Dudek AZ *et al.*, J Clin Oncol., 2018; 36 (suppl; abstr., 4558)), печеночноклеточного рака (Stein S *et al.*, J Clin Oncol, 2018, 36(15_suppl): 4074; бевацизумаб в комбинации с атезолизумабом для лечения печеночноклеточного рака одобрен FDA в 2020 г.), колоректального рака (включая MSI-H/dMMR- и не-MSI-H/dMMR-типы) (Bendell JC *et al.*, Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at: American Society of Clinical Oncology; May 29-June

2, 2015; Chicago, IL. 2015; abstract 704; Hochster HS *et al.*, Efficacy and safety of atezolizumab (atezo) and bevacizumab (bev) in a phase Ib study of microsatellite instability (MSI)-high metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at: American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; January 19-21, 2017; San Francisco, CA. 2017; abstract 673), рака молочной железы (Yukinori Ozaki *et al.*, A multicenter phase II study evaluating the efficacy of nivolumab plus paclitaxel plus bevacizumab triple-combination therapy as a first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer: WJOG9917B NEWBEAT trial [abstract]. In: Proceedings of the 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2019 Dec 10-14; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2020; 80(4 Suppl): Abstract nr PD1-03); комбинация антитела к VEGFR2 и антитела к PD-1 также продемонстрировала хорошие противоопухолевые эффекты при аденокарциноме желудка и аденокарциноме гастроэзофагеального перехода (Herbst RS *et al.*, Lancet Oncol. 2019; 20(8): 1109-1123); кроме того, комбинированная схема с антителом к PD-1 (пембролизумаб) и ингибитором ангиогенеза (ленватиниб) продемонстрировала хорошую эффективность при лечении эндометриального рака и в 2019 г. была одобрена FDA для применения в лечении эндометриального рака. Антитела к PD-1/PD-L1 демонстрируют хорошую эффективность применительно к меланоме (антитела к PD-1 ниволумаб и пембролизумаб одобрены FDA для применения в лечении меланомы), раку шейки матки (Krishnansu S. *et al.*, N Engl J Med., 2014; 370: 734-743), глиоме, раку предстательной железы (Antonarakis ES. *et al.*, J Clin Oncol., Feb 10, 2020; 38(5): 395-405), уротелиальному раку (Joaquim Bellmunt. *et al.*, N Engl J Med., 2017; 376: 1015-1026; ниволумаб для применения в лечении рака мочевого пузыря одобрен FDA в 2017 г.), раку пищевода (Kato K *et al.*, Lancet Oncol., 2019; 20(11): 1506-17), мезотелиоме (Scherpereel A *et al.*, Lancet Oncol., 2019; 20(2): 239-253) и тому подобному, и, учитывая синергичное действие путей PD-1 и VEGF при развитии опухолей, можно ожидать, что лекарственные средства, блокирующие как путь PD-1, так и путь VEGF, будут иметь лучшие противоопухолевые эффекты.

Биспецифическое антитело, также известное как биспецифическое антитело, представляет собой специфичное лекарственное средство, которое направлено на два разных антигена одновременно и может быть получено посредством иммуноселективной очистки. Кроме того, биспецифическое антитело может также быть

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

ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) относится к уничтожению клетки-мишени клеткой-киллером (NK-клетками, макрофагами и так далее), опосредованному связыванием Fab-фрагмента антитела с эпитопом клетки, инфицированной вирусом, или опухолевой клетки и связыванием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецептором (FcR) на поверхности клетки-киллера.

CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) относится к тому, что специфичное связывание антитела с соответствующим антигеном на поверхности клеточной мембраны приводит к образованию комплекса и активирует систему комплемента, что ведет к формированию MAC на поверхности клетки-мишени и, в результате, к последующему лизису клетки-мишени. Компоненты системы комплемента могут приводить к лизису различных бактерий и других патогенных микроорганизмов и являются важным механизмом защиты от инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами.

Fc-рецепторы принадлежат к семейству иммуноглобулинов и экспрессированы на поверхности определенных иммунных клеток для распознавания Fc-областей антител и опосредования иммунных ответов. После распознавания антигена Fab-областью Fc-область антитела связывается с Fc-рецептором на иммунной клетке (например,

клетке-киллере), запуская ответную функцию иммунной клетки, такую как фагоцитоз и ADCC.

Исходя из типа антитела, распознаваемого Fc-рецептором, и типа клеток, экспрессирующих Fc-рецептор, Fc-рецепторы классифицируют на три основных типа, FcγR, FcαR и FcεR. FcγR можно дополнительно классифицировать на четыре подтипа, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcRn (неонатальный Fc-рецептор). Из них FcγRI, FcγRII и FcγRIII тесно связаны с ADCC-эффектом. FcγRIII является наиболее распространенной молекулой, опосредующей ADCC, и представлен двумя высоко гомологичными подтипами, FcγRIIIa и FcγRIIIb, в клетках различных типов. В популяциях FcγRIIIa присутствуют два подтипа, различающиеся сайтами однонуклеотидного полиморфизма (SNP), FcγRIIIa_V158 с высокой аффинностью и FcγRIIIa_F158 с низкой аффинностью. FcγRI обладает более высокой аффинностью в отношении Fc-области IgG и участвует в процессе ADCC; FcγRII включает три подтипа FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIc (также называемые CD32a, CD32b и CD32c, соответственно), из которых ADCC-активностью обладает FcγRIIa; применительно к FcγRIIa, у людей присутствуют два подтипа, FcγRIIa_H131 и FcγRIIa_R131, что обусловлено однонуклеотидной мутацией (Hogarth PM, Pietersz GA. 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4): 311-331).

Семейство IgG включает четырех представителей, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, различающихся аминокислотами в области кристаллизуемого фрагмента (Fc-области) константной области тяжелой цепи, что приводит к различиям их аффинности в отношении FcγR. IgG1 является подтипом, наиболее распространенным у людей, и, кроме того, подтипом, чаще всего применяемым в лекарственных средствах на основе моноклональных антител. IgG1 способен связываться с различными FcγR и способен индуцировать ADCC- и CDC-эффекты. IgG2 имеет наименьшую аффинность в отношении FcγR, но все равно способен индуцировать ADCC, опосредованную моноцитами, посредством связывания с FcγRIIa. IgG3 обладает наибольшей способностью к связыванию с FcγR и может индуцировать ADCC и больший CDC-эффект, чем IgG1. Молекулы IgG4 слабо связываются с FcγR, кроме FcγRI, и молекулы IgG4 с меньшей вероятностью приводят к CDC и ADCC, опосредованной NK-клетками.

В настоящее время все еще существует потребность в разработке нового биспецифического антитела против PD-1 и против VEGFA для уменьшения или устранения негативного воздействия, оказываемого опосредованной антителами ADCC- и/или CDC-активностью против иммунных клеток, с которыми связывается биспецифическое антитело против PD-1 и против VEGFA, и для повышения эффективности лекарственного средства на основе этого антитела.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В результате интенсивных исследований и творческих усилий авторы изобретения соответствующим образом модифицировали Fc-фрагмент структуры антитела против PD-1 и против VEGFA для снижения способности Fc-области к связыванию с Fc-рецепторами, уменьшив посредством этого токсические ADCC- и CDC-эффекты и побочные эффекты на иммунные клетки и повысив эффективность лекарственного средства на основе антитела против PD-1 и против VEGFA.

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу, содержащему:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где: первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело; или первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин;

где:

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1(определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи)-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1(определяющая комплементарность область 1 легкой цепи)-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи

содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно;

или,

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно;

иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин подтипа IgG1;

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237 и константа аффинности биспецифического антитела в отношении FcγRIIIa и/или C1q снижена после мутации по сравнению с соответствующей константой до мутации; предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения, применительно к биспецифическому антителу, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

В настоящем изобретении, если не указано иное, буквы до номера положения соответствуют аминокислотам до мутации, а буквы после номера положения соответствуют аминокислотам после мутации.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где: первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело; или первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин;

где:

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно;

или,

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в

SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно;

иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин подтипа IgG1.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где: первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело; или первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин;

где:

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно;

или,

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно; применительно к

одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно;

иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин подтипа IgG1;

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения, применительно к биспецифическому антителу, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет или дополнительно имеет одну или более чем одну мутацию, выбранную из:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:17;

или,

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело выбрано из любого из следующих (1)-(12):

(1)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:7;

(2)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11;

(3)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная

последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:17;

(4)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:7;

(5)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11;

(6)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:17;

(7)

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

одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(8)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:11; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(9)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(10)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(11)

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

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3; и

(12)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:24 и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:26.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело представлено в форме IgG-scFv, то есть в формате Morrison.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения, применительно к биспецифическому антителу в одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения,

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

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

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, учетный номер P01861.1; константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи каппа Ig, учетный номер P01834.

В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, С-область цепи гамма-1 Ig (учетный номер P01857), представляет собой следующее:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:40).

В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, С-область цепи гамма-4 Ig (учетный номер P01861.1), представляет собой следующее:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:41).

В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной области легкой цепи, С-область цепи каппа Ig (учетный номер P01834), представляет собой следующее:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:42).

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина. Поскольку иммуноглобулин имеет две тяжелые цепи, с одной

молекулой иммуноглобулина связаны две молекулы одноцепочечного антитела. Предпочтительно, две молекулы одноцепочечного антитела идентичны.

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

В некоторых воплощениях настоящего изобретения между V_H и V_L одноцепочечного антитела присутствует дисульфидная связь. Способы введения дисульфидной связи между V_H и V_L антитела хорошо известны в данной области, см., например, US 5,747,654; Rajagopal *et al.*, Prot. Engin., 10(1997)1453-1459; Reiter *et al.*, Nat. Biotechnol., 14(1996)1239-1245; Reiter *et al.*, Protein Engineering, 8(1995)1323-1331; Webber *et al.*, Molecular Immunology, 32(1995)249-258; Reiter *et al.*, Immunity, 2(1995)281-287; Reiter *et al.*, JBC, 269(1994)18327-18331; Reiter *et al.*, Inter. J. of Cancer, 58(1994)142-149; или Reiter *et al.*, Cancer Res. 54(1994)2714-2718; включенные сюда посредством ссылки.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где первая белковая функциональная область связана со второй белковой функциональной областью непосредственно или через линкерный фрагмент и/или вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела непосредственно или через линкерный фрагмент.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения, применительно к биспецифическому антителу, линкерный фрагмент представляет собой (GGGGS)n, где n представляет собой положительное целое число; предпочтительно, n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения, применительно к биспецифическому антителу, каждое из числа первых белковых функциональных областей и числа вторых белковых функциональных областей независимо составляет 1, 2 или более.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой

цепи иммуноглобулина.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где число первых белковых функциональных областей составляет 1 и число вторых белковых функциональных областей составляет 2;

первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело;

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:24, и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:26;

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:17;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая белковая функциональная область связана со второй белковой функциональной областью через первый линкерный фрагмент, и вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются одинаковыми или разными;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента независимо выбраны из SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:19;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO:18.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с FcγRI с константной аффинности менее чем приблизительно 10^{-6} M, такой как менее чем приблизительно 10^{-7} M, 10^{-8} M или 10^{-9} M или менее;

предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C1q с константной аффинности менее чем приблизительно 10^{-9} M, такой как менее чем приблизительно 10^{-7} M, 10^{-8} M или 10^{-9} M или менее; предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, связывающееся с белком VEGFA и/или белком PD-1 с K_D менее чем 10^{-5} M, такой как менее чем 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или менее; предпочтительно, K_D измерена посредством системы от Fortebio.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где:

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

и/или

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

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую здесь.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину,

содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанные здесь.

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

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

где, предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, способное специфично распознавать иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент; возможно, второе антитело дополнительно содержит выявляемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

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

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или конъюгат по любому воплощению настоящего изобретения; возможно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Биспецифическое антитело по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть включены в любую лекарственную форму, известную в области фармацевтики, такую как таблетка, пилюля, суспензия, эмульсия, раствор, гель, капсула, порошок, гранула, эликсир, пастилка, суппозиторий, лекарственная форма для инъекций (включая раствор для инъекций, стерильный порошок для инъекций и концентрированный раствор для инъекций), лекарственная форма для ингаляций и спрей. Предпочтительная лекарственная форма зависит от

предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению должна быть стерильной и стабильной в условиях изготовления и хранения. Одной предпочтительной лекарственной формой является лекарственная форма для инъекций. Такие лекарственные формы для инъекций могут представлять собой стерильные растворы для инъекций. Например, стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены следующим способом: необходимое количество биспецифического антитела по настоящему изобретению добавляют в подходящий растворитель и, возможно, в то же время добавляют другие желаемые ингредиенты (включая, без ограничения, регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты, агенты, увеличивающие ионную силу, изотонические агенты, консерванты, разбавители или любую их комбинацию) с последующей фильтрацией и стерилизацией. Кроме того, стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены в форме стерильных лиофилизированных порошков (например, вакуумной сушкой или лиофилизацией) для удобства хранения и применения. Такие стерильные лиофилизированные порошки могут быть диспергированы в подходящем носителе (например, стерильной апирогенной воде) перед применением.

Кроме того, биспецифическое антитело по настоящему изобретению может присутствовать в фармацевтической композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения. В некоторых воплощениях стандартная доза составляет по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 20 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или по меньшей мере 100 мг. Там, где фармацевтическая композиция представлена в жидкой лекарственной форме (например, лекарственной форме для инъекций), она может содержать биспецифическое антитело по настоящему изобретению в концентрации по меньшей мере 0,1 мг/мл, такой как по меньшей мере 0,25 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

Биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция по настоящему

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

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

В настоящем изобретении схема введения может быть скорректирована для достижения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, она может представлять собой однократное введение, может представлять собой многократное введение на протяжении некоторого периода времени или может характеризоваться снижением или повышением дозы пропорционально степени неотложности лечения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли

почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению в изготовлении следующих лекарственных средств:

(1)

лекарственного средства или агента для определения уровня VEGFA в образце,

лекарственного средства или агента для блокировки связывания VEGFA с VEGFR2,

лекарственного средства или агента для понижающей регуляции активности или уровня VEGFA,

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

лекарственного средства или агента для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

лекарственного средства или агента для блокировки опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

лекарственного средства или агента для блокировки связывания PD-1 с PD-L1,

лекарственного средства или агента для понижающей регуляции активности или уровня PD-1,

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

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

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

В *in vitro* эксперименте по настоящему изобретению как антитело против VEGFA, так и биспецифическое антитело против VEGFA и против PD-1 могут ингибировать пролиферацию клеток HUVEC и как антитело против PD-1, так и биспецифическое антитело против VEGFA и против PD-1 могут стимулировать секрецию IFN-γ и/или IL-2 и активировать иммунную реакцию.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по любому воплощению настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

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

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, выбранному из:

(1)

способа определения уровня VEGFA в образце,

способа блокировки связывания VEGFA с VEGFR2,

способа понижающей регуляции активности или уровня VEGFA,

способа уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

способа изготовления лекарственного средства или агента для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

способа блокировки опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

способа блокировки связывания PD-1 с PD-L1,

способа понижающей регуляции активности или уровня PD-1,

способа уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

способа стимуляции секреции IFN-γ Т-лимфоцитами или

способа стимуляции секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело или конъюгат применяют в лечении и/или предупреждении злокачественной опухоли; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В одном или более чем одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело или конъюгат применяют для:

(1)

определения уровня VEGFA в образце,

блокировки связывания VEGFA с VEGFR2,

понижающей регуляции активности или уровня VEGFA,

уменьшения стимулирующего действия VEGFA на пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов,

ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов или

блокировки опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

блокировки связывания PD-1 с PD-L1,

понижающей регуляции активности или уровня PD-1,

уменьшения иммуносупрессивного действия PD-1 в организме,

стимуляции секреции IFN-γ Т-лимфоцитами или

стимуляции секреции IL-2 Т-лимфоцитами.

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

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

Предпочтительно, CDR могут также быть определены по системе нумерации IMGT, см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 38.suppl_1 (2009): D301-D307.

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

результаты.

(1) Бевацизумаб

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO:3.

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

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO:28);

HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO:29);

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO:30);

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

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO:31);

LCDR2: FTS (SEQ ID NO:32);

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO:33).

(2) 14C12, 14C12H1L1 или 14C12H1L1 (M)

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

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO:34);

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO:35);

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:36);

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

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO:37);

LCDR2: RAN (SEQ ID NO:38);

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:39).

(3) VP101 (hG1WT) или VP101 (hG1DM)

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

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO:28);

HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO:29);

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO:30);

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO:34);

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO:35);

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:36);

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO:37);

HCDR8: RAN (SEQ ID NO:38);

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:39);

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

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO:31);

LCDR2: FTS (SEQ ID NO:32);

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO:33).

В случае антитела VP101 (hG1DM) по настоящему изобретению аминокислотные мутации введены в невариабельную область VP101 (hG1WT). Согласно системе нумерации EU, аминокислотные мутации введены в положения 234 и 235.

VP101 (hG1DM) получено проведением точковой мутации с заменой лейцина на аланин в положении 234 (L234A) и точковой мутации с заменой лейцина на аланин в положении 235 (L235A) в шарнирной области тяжелой цепи.

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

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

или изменений (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления) без влияния на его биологические функции. Поэтому в настоящем изобретении термин «белок VEGFA» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, описание фрагмента последовательности белка VEGFA также включает соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах. В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность белка VEGFA показана как подчеркнутая часть SEQ ID NO:33 (без последних 6 His, в общей сложности 302 аминокислоты).

При использовании здесь указание аминокислотной последовательности белка VEGFR2 (также известного как KDR, идентификатор в GenBank NP_002244) включает полноразмерный белок VEGFR2, или внеклеточный фрагмент VEGFR2 VEGFR2-ECD, или фрагмент, содержащий VEGFR2-ECD, и также включает слитый белок VEGFR2-ECD, такой как фрагмент, слитый с белковым Fc-фрагментом мышиного или человеческого IgG (mFc или hFc). Тем не менее, специалистам в данной области будет ясно, что в аминокислотной последовательности белка VEGFR2 возможно появление естественных или введение искусственных мутаций или изменений (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления) без влияния на его биологические функции. Поэтому в настоящем изобретении термин «белок VEGFR2» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, описание фрагмента последовательности белка VEGFR2 также включает соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах. В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная последовательность внеклеточного фрагмента VEGFR2 VEGFR2-ECD представлена в SEQ ID NO:34 (766 аминокислот).

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

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

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

При использовании здесь термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух пар полипептидных цепей (в каждой паре есть одна «легкая» (L) цепь и одна «тяжелая» (H) цепь). В общем смысле, тяжелую цепь можно интерпретировать как полипептидную цепь антитела с большей молекулярной массой, а легкая цепь относится к полипептидной цепи антитела с меньшей молекулярной массой. Легкие цепи классифицируют как легкие цепи κ и λ. Тяжелые цепи обычно классифицируют как μ, δ, γ, α или ε, а изотипы антител определяют как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких цепях и тяжелых цепях вариабельная область и константная область соединены «J-областью» из приблизительно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также содержит «D-область» из приблизительно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область

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

При использовании здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент», также известный как «антигенсвязывающая часть», относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность к специфичному связыванию с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфичное связывание с антигеном. В

целом, см. Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)). Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен методикой рекомбинантных ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактного антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb и фрагмент участка, определяющего комплементарность (CDR), фрагмент одноцепочечного антитела (например, scFv), химерного антитела, диатело и полипептид, содержащий по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания полипептиду способности к специфичному связыванию с антигеном.

При использовании здесь термин «Fd-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_H1; термин «Fv-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одной ветви антитела; термин «dAb-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward *et al.*, Nature 341 (1989): 544-546); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L, V_H, C_L и C_H1; и термин «$F(ab')_2$-фрагмент» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанные дисульфидной связью в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), где домены V_L и V_H образуют пару с получением моновалентной молекулы через линкер, позволяющий им образовывать единую полипептидную цепь (см., например, Bird *et al.*, Science 242 (1988): 423-426 и Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988): 5879-5883). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру NH_2-V_L-линкер-V_H-COOH или NH_2-V_H-линкер-V_L-COOH. В предшествующем уровне техники подходящий линкер состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, может быть использован линкер, имеющий аминокислотную последовательность $(GGGGS)_4$, а также могут быть использованы его варианты (Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993): 6444-6448). Другие линкеры, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны в Alfthan *et al.*, Protein Eng. 8 (1995): 725-731, Choi *et al.*, Eur. J. Immunol., 31 (2001): 94-106, Hu *et al.*, Cancer Res. 56 (1996): 3055-3061, Kipriyanov *et al.*, J. Mol. Biol., 293 (1999): 41-56, и Roovers *et al.*, Cancer Immunol. (2001).

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, то есть бивалентное антитело, в котором домены V_H и V_L экспрессированы на одной полипептидной цепи. Тем не менее, используемый линкер слишком короткий для образования пары из двух доменов, расположенных на одной и той же цепи, что вынуждает домены образовывать пары с комплементарными доменами на другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993): 6444-6448, и Poljak R. J. *et al.*, Structure 2 (1994): 1121-1123).

Антигенсвязывающие фрагменты (например, указанные выше фрагменты антител) антител могут быть получены из заданных антител с применением обычных методик, известных специалистам в данной области (например, посредством методики рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления), и полученные антигенсвязывающие фрагменты антител подвергают скринингу на предмет специфичности таким же образом, как интактные антитела.

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

При использовании здесь термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или его фрагменту, имеющим происхождение от группы в высокой степени гомологичных антител, то есть от группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут происходить спонтанно. Моноклональное антитело имеет высокую специфичность в отношении одного эпитопа антигена. Поликлональное антитело, в отличие от моноклонального антитела, обычно включает по меньшей мере два или более чем два разных антитела, которые обычно распознают разные эпитопы антигена. Моноклональные антитела могут обычно быть получены гибридомной методикой, впервые описанной Kohler *et al.* (Nature, 256: 495, 1975), и могут также быть получены методикой рекомбинантных ДНК (например, см. патент США № 4,816,567).

При использовании здесь термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть легкой и/или тяжелой цепи имеет происхождение от одного антитела (которое может иметь происхождение от определенного вида или принадлежать к

определенному классу или подклассу антител), а другая часть легкой и/или тяжелой цепи имеет происхождение от другого антитела (которое может иметь происхождение от того же или другого вида или принадлежать к тому же или другому классу или подклассу антител). Но в любом случае, оно сохраняет связывающую активность в отношении целевого антигена (патент США 4,816,567, Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984): 6851-6855).

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

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

антителом), расположены в первичной аминокислотной последовательности белка линейно. В конформационном эпитопе сайты, принимающие участие во взаимодействии, расположены при аминокислотных остатках белка, отделенных друг от друга.

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

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

энхансерные последовательности, селекционные элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

При использовании здесь термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NS0, клетки HeLa, клетки BHK, клетки HEK 293, или человеческие клетки.

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

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

При использовании здесь термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, аминокислоты

обычно обозначены здесь однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области. Например, аланин может быть обозначен как A или Ala.

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

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

При использовании здесь термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или по меньшей мере частичного получения желаемых эффектов. Например, профилактически эффективное количество (например, применительно к заболеванию, сопровождающемуся связыванием PD-1 с PD-L1 или сверхэкспрессией VEGF, такому как опухоль) представляет собой количество, достаточное для предупреждения, остановки или задержки начала заболевания (например, заболевания, сопровождающегося связыванием PD-1 с PD-L1 или сверхэкспрессией VEGF, такого как опухоль); терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для излечения или по меньшей мере

частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, страдающего от этого заболевания. Несомненно, специалисты в данной области могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтических задач, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния собственной иммунной системы пациента, параметров общего состояния пациента, таких как возраст, масса тела и пол, пути введения, сопутствующего применения других видов лечения и так далее.

Термин «MSI» относится к микросателлитной нестабильности. Микросателлиты представляют собой короткие тандемные повторы в геноме человека, включающие 10-50 повторов из одного, двух или более нуклеотидов. В определенных аномальных клетках, таких как опухоли, длина микросателлитов изменяется по сравнению с нормальными клетками в результате вставок или делеций повторяющихся единиц. Такие изменения называют MSI. Исходя из степени нестабильности, MSI можно классифицировать как высокую микросателлитную нестабильность (MSI-H), низкую микросателлитную нестабильность (microsatellite instability-low, MSI-L) микросателлитную стабильность (MSS). Основной причиной MSI является дефицит репарации неспаренных оснований ДНК (mismatch repair, MMR). Человеческие гены репарации неспаренных оснований (MMR-гены) могут экспрессировать соответствующие белки репарации неспаренных оснований посредством транскрипции и трансляции. Отсутствие какого-либо MMR-белка может приводить к дефициту репарации неспаренных оснований, и, вследствие такого дефицита, при репликации ДНК будет происходить накопление неспаренных оснований, в конечном счете приводя к MSI. Приблизительно 15% случаев колоректального рака связаны с путем MSI. Впервые это было обнаружено при колоректальном раке, но также возможно при раке желудка, эндометриальном раке, раке коры надпочечников и тому подобном (Baretti M *et al.*, Pharmacol Ther., 2018; 189: 45-62). В последующих исследованиях признаки MSI-H/dMMR были также обнаружены при мезотелиоме, саркоме, раке коры надпочечников, злокачественной меланоме и герминоклеточной опухоли яичника.

MSI-H и dMMR отражают результаты двух разных анализов и биологически связаны друг с другом, что называют MSI-H/dMMR или высокой MSI/dMMR, в то время как MSI-L и MSS являются фенотипами достаточной репарации неспаренных оснований

(proficient mismatch repair, pMMR). Выявление dMMR состоит в проведении иммуногистохимического анализа экспрессии белков четырьмя генами, связанными с неспаренными основаниями, MSH2, MLH1, MSH6 и PMS2, в опухолевых образцах (включая образцы, полученные хирургическим путем и посредством аспирации). Отсутствие какого-либо из этих четырех белков подтверждает dMMR; положительные результаты по всем четырем белкам указывают на pMMR, то есть на полноценную функцию репарации неспаренных оснований. Выявление MSI состоит в сопоставлении длины повторяющихся последовательностей ДНК (микросателлитных последовательностей) в опухолевых клетках и соматических клетках и в сравнении их длины. При выявлении 5 стандартных локусов с применением PCR (полимеразная цепная реакция) на основе стандарта Американского NCI, несовпадения в двух или более локусах указывают на нестабильность, определяемую как MSI-H, один несовпадающий локус указывает на MSI-L, а 5 совпадающих локусов указывают на MSS. В качестве метода выявления микросателлитной нестабильности может также быть применено высокопроизводительное секвенирование (также называемое секвенированием нового поколения (NGS)). При выборе большего числа микросателлитных локусов, такого как более 5 локусов, или дополнительных микросателлитных локусов для PCR-анализа, несовпадение в 30% локусов или более определяют как MSI-H, совпадение во всех локусах определяют как MSS и несовпадение в 0-30% определяют как MSI-L.

Полезные эффекты

Настоящее изобретение позволяет достичь одного или более из следующих технических эффектов (1)-(4).

(1) Модификация Fc-фрагмента антитела по настоящему изобретению полностью устраняет связывающую активность VP101(hG1WT) в отношении Fc-рецепторов FcγRI и FcγRIIIa_F158, полностью устраняя посредством этого ADCC-активность.

(2) Модификация Fc-фрагмента антитела по настоящему изобретению полностью устраняет связывающую активность VP101(hG1WT) в отношении компонента комплемента C1q, полностью устраняя посредством этого CDC-активность.

(3) Биспецифическое антитело по настоящему изобретению может хорошо и специфично связываться с VEGFA, может эффективно блокировать связывание VEGFA

с VEGFR2 и специфично уменьшает иммуносупрессивное действие VEGFA в организме и стимулирующий эффект VEGFA на ангиогенез.

(4) Биспецифическое антитело по настоящему изобретению может хорошо и специфично связываться с PD-1, может эффективно блокировать связывание PD-1 с PD-L1, специфично уменьшает иммуносупрессивное действие PD-1 в организме и активирует иммунный ответ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении FcγRI. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 2: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении FcγRI. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 3: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении FcγRI. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 4: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении FcγRI. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 5: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении FcγRI. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 6: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIa_H131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 7: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении FcγRIIa_H131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 8: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении FcγRIIa_H131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 9: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении FcγRIIa_H131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 10: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении FcγRIIa_H131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 11: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIa_R131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 12: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении FcγRIIa_R131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 13: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении FcγRIIa_R131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 14: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении FcγRIIa_R131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 15: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении FcγRIIa_R131. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 16: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIIa_V158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 17: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении FcγRIIIa_V158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 18: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении FcγRIIIa_V158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 19: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении FcγRIIIa_V158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 20: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении FcγRIIIa_V158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 21: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIIa_F158. Концентрации антигена для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 22: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении FcγRIIIa_F158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 23: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении FcγRIIIa_F158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 24: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении FcγRIIIa_F158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 25: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении FcγRIIa_F158. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 26: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) в отношении C1q. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 27: Анализ константы аффинности бевацизумаба в отношении C1q. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 28: Анализ константы аффинности ниволумаба в отношении C1q. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 29: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) в отношении C1q. Концентрации антитела для пар кривых, сверху вниз, составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 30: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) в отношении C1q. Концентрации антигена для пар кривых, сверху вниз, составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 31: Анализ ADCC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в системе с клетками-мишенями CHO-K1-PD1, экспрессирующими антиген PD-1.

ФИГ. 32: Анализ CDC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в системе с клетками-мишенями CHO-K1-PD1, экспрессирующими антиген PD-1.

ФИГ. 33: Эффекты антитела VP101(hG1DM) на секрецию цитокина IFN-γ, индуцированную смешанной культурой PBMC (мононуклеарных клеток периферической крови) и клеток Raji-PDL1, определенные методом ELISA.

ФИГ. 34: Эффекты антитела VP101(hG1DM) на секрецию цитокина IL-2, индуцированную смешанной культурой PBMC и клеток Raji-PDL1, определенные методом ELISA.

ФИГ. 35: Анализ ADCP-активности VP101(hG1DM) в системе с клетками-мишенями CHO-K1-PD1, экспрессирующими антиген PD-1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее воплощения настоящего изобретения будут подробно описаны посредством примеров. Специалистам в данной области будет ясно, что последующие примеры приведены исключительно для пояснения настоящего изобретения и их не следует толковать как ограничения объема настоящего изобретения. В случаях отсутствия конкретных описаний методик или условий применяли методики или условия, описанные в литературе, относящейся к данной области (например, см. Guide to Molecular Cloning Experiments, авторы J. Sambrook *et al.*, перевод Huang Peitang *et al.*, третье издание, Science Press), или в руководствах по применению соответствующих продуктов. При отсутствии указаний на изготовителей использованных реагентов или приборов, все эти реагенты или приборы представляли собой обычные реагенты или приборы, имеющиеся в продаже.

В последующих примерах настоящего изобретения имеющееся в продаже антитело бевацизумаб (торговое название Авастин®), направленное на ту же мишень, было приобретено у Roche в качестве контрольного антитела или было получено в соответствии с Примером получения 1.

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

В последующих примерах настоящего изобретения использованное антитело изотипического контроля представляет собой человеческий IgG против лизоцима куриного яйца (антитело против HEL или человеческий IgG, сокращенно hIgG), последовательности вариабельных областей которого взяты из исследования, названного «Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies [Созревание аффинности повышает стабильность и пластичность Fv-домена противобелковых антител]», опубликованного Acierno *et al.* (Acierno *et al.*, J Mol Biol., 2007; 374(1): 130-46). hIgG1DM и hIgG4WT, использованные в примерах, представляют собой антитела изотипического контроля против HEL с последовательностями константных областей hG1DM и hG4WT. Антитела изотипического контроля были получены в лаборатории Akeso Biopharma, Inc.

<u>Пример получения 1: Получение антитела бевацизумаб против VEGFA</u>

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

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1).

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

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTC
TCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAAT
TGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACT
TACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCC
TGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGG
ACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTG
GTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC
(SEQ ID NO:2).

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO:3).

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

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACTACCTGAATTGGT
ATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCT
GCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACT
CTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTA
TTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG
(SEQ ID NO:4).

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

кДНК (комплементарная ДНК) тяжелой цепи и кДНК легкой цепи бевацизумаба клонировали в вектор pcDNA3.1 с получением рекомбинантной экспрессионной плазмиды антитела бевацизумаб. Полученной рекомбинантной плазмидой трансфицировали клетки 293F. Культуральную среду клеток 293F очищали и затем осуществляли выявление.

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

Пример получения 2: Разработка последовательностей антиела 14C12, гуманизированного антитела 14C12H1L1 и мутантного 14C12H1L1(M) против PD-1

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела против PD-1 14C12 и гуманизированного антитела 14C12H1L1 идентичны аналогичным последовательностям 14C12 и 14C12H1L1, приведенным в публикации патента Китая № CN106967172A, соответственно.

(1) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи 14C12

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12 (118 а/к):

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATIS GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:5).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 14C12 (354 п.о.):

GAGGTCAAACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGGTC ACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCAT GGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCAGCGGAG GCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCG GGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGAT ACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGG GACAGGGCACCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO:6).

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12 (107 а/к):

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:7).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи 14C12 (321 п.о.):

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAG
CGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGT
TTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGAC
TGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTC
CCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAG
TATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAACTGGAACTGAAG
(SEQ ID NO:8).

(2) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи и последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12H1L1 (118 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9).

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

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTC
ACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCT
GGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAG
AGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGA
CACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGG
GGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO:10).

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12H1L1 (107 а/к):

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO:11).

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

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

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (14C12H1) 14C12H1L1 (448 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:13).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь (14C12H1) 14C12H1L1 (1344 п.о.):

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTC
ACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCT
GGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAG
AGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGA
CACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGG
GGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTG
TTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGAT
GTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGC

TCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTAT
TCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACA
TCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGC
CCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCCTGCTCCCGAACTCCT
CGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
AGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCG
AGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCA
AGCCCAGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAG
TCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA
AGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCA
GGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACCAAGAACCA
GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAG
TGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTG
GCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCAC
TACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO:14).

Аминокислотная последовательность легкой цепи (14C12L1) 14C12H1L1 (214 а/к):

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь (14C12L1) 14C12H1L1 (642 п.о.):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGAC
AGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGT
TTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGAC
TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACAC
TCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAG
TATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAGCGAA
CTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCA

GGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAG
TGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGA
CTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTC
CAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGG
ACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO:16).

(3) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи 14C12H1L1(M)

Для получения 14C12H1L1(M) были проведены мутации отдельных аминокислот каркасной области (легкой цепи) 14C12H1L1.

Вариабельная область тяжелой цепи 14C12H1(M) 14C12H1L1(M):

идентична вариабельной области тяжелой цепи 14C12H1 14C12H1L1; то есть ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO:9.

Вариабельная область легкой цепи 14C12L1(M) 14C12H1L1(M) (108 а/к, мутантные положения в аминокислотной последовательности, основанной на 14C12H1L1, подчеркнуты):

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR
(SEQ ID NO:17).

Пример получения 3: Разработка последовательностей биспецифических антител

1. Разработка последовательностей

По структуре биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой форму Morrison (IgG-scFv), то есть каждый из C-концов двух тяжелых цепей антитела IgG связан с scFv-фрагментом другого антитела, и основной состав тяжелой и легкой цепей показан в Таблице 1 ниже.

Антитело VP101 на основе бевацизумаба, где в качестве части, представленной scFv-фрагментом, взяты аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 14C12H1L1(M), названо VP101(M). По сравнению с 14C12H1L1, 14C12H1L1(M) позволило эффективно оптимизировать структуру биспецифического антитела и повысило его эффективность.

Таблица 1: Состав тяжелых и легких цепей VP101(M) и VP101(G4M)

№ биспецифического антитела	Иммуноглобулиновая группировка		Линкерный фрагмент	scFv-часть
	Тяжелая цепь	Легкая цепь		
VP101(M)	Бевацизумаб-H	Бевацизумаб-L	Линкер-1	14C12H1(M)$_V$ – линкер-1 – 14C12L1(M)$_V$
VP101(G4M)	Бевацизумаб-G4H	Бевацизумаб-L	Линкер-1	14C12H1(M)$_V$ – линкер-1 – 14C12L1(M)$_V$

В Таблице 1 выше:

(1) Отмеченное «V» в нижнем правом углу относится к вариабельной области соответствующей тяжелой цепи или вариабельной области соответствующей легкой цепи. Без отметки «V» соответствующая тяжелая или легкая цепь является полноразмерной и содержит константную область. Соответствующие последовательности, описанные в приведенных выше примерах получения, относятся к аминокислотным последовательностям этих вариабельных областей или полноразмерных цепей и к кодирующим их нуклеотидным последовательностям.

(2) Аминокислотная последовательность линкера-1 представляет собой GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18). Возможно, в качестве линкера-2, вместо указанного выше линкера-1, может быть использована аминокислотная последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:19).

(3) В бевацизумаб-H в качестве константной области тяжелой цепи использована C-область цепи гамма-1 Ig (учетный номер P01857).

(4) В бевацизумаб-G4H в качестве константной области тяжелой цепи использована C-область цепи гамма-4 Ig (учетный номер P01861.1).

2. Экспрессия и очистка антитела VP101(M)

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

Плазмиды pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L расщепляли ферментами (HindIII и EcoRI), и тяжелую и легкую цепи, выделенные электрофорезом,

субклонировали в вектор pcDNA3.1 и выделяли рекомбинантные плазмиды для котрансфекции клеток 293F. После 7 суток культивирования клеток культуральную среду центрифугировали на высокой скорости, надосадочную жидкость концентрировали и наносили на колонку HiTrap MabSelect SuRe. Затем белок элюировали за одну стадию элюирующим буфером, получали образцы выделенного целевого антитела VP101 и осуществляли замену буфера на PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор).

3. Выявление антитела VP101(M)

Очищенный образец вносили как в загрузочный буфер для белкового электрофореза в восстанавливающих условиях, так и в загрузочный буфер для белкового электрофореза в невосстанавливающих условиях и затем подвергали кипячению для выявления антитела посредством SDS-PAGE-электрофореза (электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия).

Для отличия от мутантного антитела по Примеру получения 4, в настоящем изобретении VP101(M) также обозначено как VP101(hG1WT). VP101(M), описанное выше, является антителом «дикого типа» ("wild-type") и содержит С-область цепи гамма-1 Ig (учетный номер P01857) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область цепи каппа Ig (учетный номер P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1WT) (453 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI
NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:20).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1WT) (1359 п.о.):

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTC
TCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAAT
TGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACT
TACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCC
TGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGG
ACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTG
GTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCAC
CAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGA
ACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGA
GCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCA
AAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCC
TGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAG
CCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCAC
AACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTG
TCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCA
AAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACT
CACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACC
CCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAACTGACCGTCGA
TAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCA
CTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
(SEQ ID NO:21).

Для отличия от мутантного антитела по Примеру получения 4, в настоящем изобретении VP101(G4M) также обозначено как VP101(hG4WT). VP101(G4M), описанное выше, является антителом «дикого типа» ("wild-type") и содержит С-область

цепи гамма-1 Ig (учетный номер P01861.1) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область цепи каппа Ig (учетный номер P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулиновой группировки VP101(hG4WT) (450 а/к):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI
NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K (SEQ ID NO:22).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулиновой группировки VP101(hG4WT) (1350 п.о.):

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTC
TCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAAT
TGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACT
TACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCC
TGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGG
ACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTG
GTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCAC
CAAAGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC
ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTG
AGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAA

GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACACAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:23).

<u>Пример получения 4: Разработка аминокислотных мутаций невариабельной области на основе гуманизированного биспецифического антитела VP101(hG1WT)</u>

На основе VP101(hG1WT), полученного в Примере получения 3, было получено VP101(hG1DM) посредством проведения точковой мутации с заменой лейцина на аланин в положении 234 (L234A) и точковой мутации с заменой лейцина на аланин в положении 235 (L235A) тяжелой цепи.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1DM) (453 а/к, мутантные положения подчеркнуты):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI
NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:24).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1DM) (1359 п.о., мутантные положения подчеркнуты):

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTC
TCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAAT
TGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACT
TACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCC
TGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGG
ACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTG
GTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCAC
CAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGA
ACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGA
GCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCA
AAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCC
TGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAG
CCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCAC
AACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTG
TCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCA
AAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACT
CACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACC
CCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAACTGACCGTCGA
TAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCA
CTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
(SEQ ID NO:25).

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности иммуноглобулиновых группировок VP101(hG1DM), VP101(hG1WT) и VP101(hG4WT) идентичны.

Аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1DM) (214 а/к):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:26).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь иммуноглобулиновой группировки VP101(hG1DM) (642 п.о.):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGAC AGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGT TTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGAC TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACAC TCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAG TATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAGCGAA CTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCA GGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAG TGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGA CTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTC CAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGG ACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO:27).

<u>Пример 1: Анализ константы аффинности FcγRI в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)</u>

Fc-рецептор FcγRI, также известный как CD64, может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и вовлечен в антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Способность терапевтического моноклонального антитела к связыванию с Fc-рецепторами будет влиять на безопасность и эффективность антитела.

В данном эксперименте для оценки ADCC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRI с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности антител в отношении FcγRI с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для разведения образцов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA (бычий сывороточный альбумин), pH 7,4. FcγRIa, 1 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре

HIS1K на протяжении 50 с. Сенсор уравновешивали в буфере на протяжении 60 с и связывание CD64, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 3,12-50 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 120 с. Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 120 с. Сенсор восстанавливали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,3 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Константы аффинности FcγRI в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 1 и на ФИГ. 1-5.

Таблица 1: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с FcγRI

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	3,68E-09	6,61E+05	2,07E+04	2,44E-03	9,02E-05	0,46-0,49
Ниволумаб	6,20E-09	6,98E+05	2,22E+04	4,32E-03	9,88E-05	0,48-0,53
VP101(hG1WT)	3,95E-09	5,67E+05	1,82E+04	2,24E-03	9,02E-05	0,68-0,80
VP101(hG4WT)	8,52E-09	6,28E+05	2,12E+04	5,35E-03	1,07E-04	0,61-0,65

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с FcγRI с константой аффинности 3,95 x 10^{-9} M; VP101(hG4WT) может связываться с FcγRI с константой аффинности 8,52 x 10^{-9} M; бевацизумаб может связываться с FcγRI с константой аффинности 3,68 x 10^{-9} M; ниволумаб может связываться с FcγRI с константой аффинности 6,20 x 10^{-9} M; VP101(hG1DM) не связывалось или имело крайне слабый сигнал связывания с FcγRI, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Полученные результаты показывают, что аффинность других антител в отношении FcγRI сходна, за исключением отсутствия связывания VP101(hG1DM) с FcγRI. Связывающая активность VP101(hG1DM) была эффективно устранена.

Пример 2: Анализ константы аффинности FcγRIIa_H131 в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIa_H131 (также известный как CD32a_H131) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать ADCC-эффекты.

В данном эксперименте для оценки ADCC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIa_H131 с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIa_H131 с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для иммобилизации и разведения представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и буфер для разведения аналитов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA, pH 7,4. FcγRIIa_H131, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре NTA при времени иммобилизации 60 с. Сенсор уравновешивали в буфере с PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA (pH 7,4) на протяжении 600 с блокировки и связывание FcγRIIa_H131, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 60 с. Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфате никеля. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,6 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Константы аффинности FcγRIIa_H131 в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 2 и на ФИГ. 6-10.

Таблица 2: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с FcγRIIa_H131

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	3,57E-08	1,15E+05	1,01E+04	4,11E-03	3,27E-04	0,41-0,53
Бевацизумаб	6,44E-08	2,10E+05	1,78E+04	1,36E-02	5,14E-04	0,49-0,68
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	2,28E-08	2,41E+05	1,48E+04	5,50E-03	3,49E-04	1,40-1,52
VP101(hG4WT)	3,68E-08	2,13E+05	2,43E+04	7,83E-03	6,65E-04	0,41-0,57

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с FcγRIIa_H131 с константой аффинности 2,28 x 10^{-8} M; VP101(hG4WT) может связываться с FcγRIIa_H131 с константой аффинности 3,68 x 10^{-8} M; бевацизумаб может связываться с FcγRIIa_H131 с константой аффинности 6,44 x 10^{-8} M; VP101(hG1DM) может связываться с FcγRIIa_H131 с константой аффинности 3,57 x 10^{-8} M; в то время как ниволумаб не связывался или имел крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIa_H131, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Полученные результаты показывают, что, за исключением отсутствия связывания ниволумаба с FcγRIIa_H131, другие антитела связывались с FcγRIIa_H131, при этом их аффинность снижалась в следующем порядке: VP101(hG1WT), VP101(hG1DM), VP101(hG4WT) и бевацизумаб.

Пример 3: Анализ константы аффинности FcγRIIa_R131 в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIa_R131 (также известный как CD32a_R131) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать ADCC-эффекты.

В данном эксперименте для оценки ADCC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIa_R131 с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для иммобилизации и разведения представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и буфер для разведения аналитов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA, pH 7,4. FcγRIIa_R131, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре NTA при времени иммобилизации 60 с. Сенсор уравновешивали в буфере с PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA (pH 7,4) на протяжении 600 с блокировки и связывание FcγRIIa_R131, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на

протяжении 60 с. Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфате никеля. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,6 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Константы аффинности FcγRIIa_R131 в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 3 и на ФИГ. 11-15.

Таблица 3: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с FcγRIIa_R131

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	3,35E-08	1,20E+05	9,72E+03	4,03E-03	3,08E-04	0,57-0,69
Бевацизумаб	5,16E-08	2,59E+05	1,72E+04	1,33E-02	4,52E-04	0,42-0,69
Ниволумаб	6,93E-08	4,78E+05	1,09E+05	3,31E-02	2,54E-03	0,08-0,16
VP101(hG1WT)	2,42E-08	2,14E+05	1,30E+04	5,17E-03	3,28E-04	1,75-1,92
VP101(hG4WT)	3,57E-08	1,99E+05	1,23E+04	7,09E-03	3,40E-04	0,81-1,05

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с FcγRIIa_R131 с константой аффинности 2,42 x 10^{-8} M; VP101(hG4WT) может связываться с FcγRIIa_R131 с константой аффинности 3,57 x 10^{-8} M; бевацизумаб может связываться с FcγRIIa_R131 с константой аффинности 5,16 x 10^{-8} M; ниволумаб может связываться с FcγRIIa_R131 с константой аффинности 6,93 x 10^{-8} M; VP101(hG1DM) может связываться с FcγRIIa_R131 с константой аффинности 3,35 x 10^{-8} M.

Полученные результаты показывают, что рассматриваемые антитела связывались с FcγRIIa_R131, при этом их аффинность снижалась в следующем порядке: VP101(hG1WT), VP101(hG1DM), VP101(hG4WT), бевацизумаб и ниволумаб.

Пример 4: Анализ константы аффинности FcγRIIb в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIb (также известный как CD32b) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и регулировать функции иммунных клеток.

В данном эксперименте для оценки способности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к связыванию с этим Fc-рецептором определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIb с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIb с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для иммобилизации и разведения представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и буфер для разведения аналитов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA, pH 7,4. hFCGR2B-his, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре NTA при времени иммобилизации 60 с. Сенсор уравновешивали в буфере с PBS, 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA (pH 7,4) на протяжении 600 с блокировки и связывание hFCGR2B-his, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 60 с. Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфате никеля. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,6 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Пример 5: Анализ константы аффинности FcγRIIIa_V158 в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIIa_V158 (также известный как CD16a_V158) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать ADCC-эффекты.

В данном эксперименте для оценки ADCC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIIa_V158 с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности антител в отношении FcγRIIIa_V158 посредством системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для разведения образцов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4. FcγRIIIa_V158, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре HIS1K на протяжении 120 с. Сенсор уравновешивали в буфере на протяжении 60 с и связывание hFcGR3A(V158)-his, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 60 с.

Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,3 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Константы аффинности FcγRIIIa_V158 в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 4 и на ФИГ. 16-20.

Таблица 4: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с FcγRIIIa_V158

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	1,34E-07	6,05E+05	2,36E+05	8,11E-02	7,42E-03	0,07-0,21
Бевацизумаб	2,76E-08	5,06E+05	1,14E+05	1,39E-02	1,41E-03	0,13-0,51
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	4,35E-08	2,39E+05	3,14E+04	1,04E-02	8,73E-04	0,80-1,22
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с FcγRIIIa_V158 с константой аффинности 4,35 x 10^{-8} M; VP101(hG1DM) может связываться с FcγRIIIa_V158 с константой аффинности 1,34 x 10^{-7} M; бевацизумаб может связываться с FcγRIIIa_V158 с константой аффинности 2,76 x 10^{-8} M; в то время как ниволумаб и VP101(hG4WT) не связывались или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIIa_V158, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Полученные результаты показывают, что, за исключением отсутствия связывания ниволумаба и VP101(hG4WT) с FcγRIIIa_V158, другие антитела связывались с FcγRIIIa_V158, при этом их аффинность снижалась в следующем порядке: бевацизумаб, VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM).

Пример 6: Анализ константы аффинности FcγRIIIa_F158 в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIIa_F158 (также известный как CD16a_F158) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать ADCC-эффекты.

В данном эксперименте для оценки ADCC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIIa_F158 с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении FcγRIIIa_F158 с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для разведения образцов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4. FcγRIIIa_F158, 5 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре HIS1K на протяжении 120 с. Сенсор уравновешивали в буфере на протяжении 60 с и связывание hFcGR3A(F158)-his, иммобилизованного на сенсоре, с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 60 с. Диссоциацию антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Выявление осуществляли при температуре 30°C и частоте 0,3 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности.

Константы аффинности FcγRIIIa_F158 в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 5 и на ФИГ. 21-25.

Таблица 5: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с FcγRIIIa_F158

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	9,32E-08	2,64E+05	7,16E+04	2,46E-02	2,09E-03	0,08-0,20
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	7,41E-08	2,47E+05	5,20E+04	1,83E-02	1,55E-03	0,15-0,48
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с FcγRIIIa_F158 с константой аффинности 7,41 x 10^{-8} M; бевацизумаб может связываться с FcγRIIIa_F158 с константой аффинности 9,32 x 10^{-8} M; в то время как ниволумаб, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) не связывались или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIIa_F158, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Полученные результаты показывают, что, за исключением отсутствия связывания ниволумаба, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) с FcγRIIIa_F158, другие антитела связывались с FcγRIIIa_F158, при этом их аффинность снижалась в следующем порядке: VP101(hG1WT) и бевацизумаб.

Пример 7: Анализ константы аффинности C1q в отношении VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Сывороточный компонент комплемента C1q может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать CDC-эффекты. Способность терапевтического моноклонального антитела к связыванию с C1q будет влиять на безопасность и эффективность антитела.

В данном эксперименте для оценки CDC-активности каждого антитела определяли константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении C1q с использованием системы Octet от Fortebio.

Метод определения констант аффинности антител в отношении C1q с использованием системы Octet от Fortebio кратко описан следующим образом. Буфер для разведения образцов представлял собой раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4. Антитела, 50 мкг/мл, иммобилизовали на сенсоре FAB2G при высоте иммобилизации приблизительно 2,0 нМ. Сенсор уравновешивали в буфере на протяжении 60 с и связывание антител, иммобилизованных на сенсоре, с C1q в концентрациях 0,625-10 нМ (серийное двукратное разведение) определяли на протяжении 60 с. Диссоциацию антигена и антител осуществляли в буфере на протяжении 60 с. Сенсор восстанавливали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,7, каждый раз

по 5 с. Скорость покачивания планшета с образцами составляла 1000 об/мин при температуре 30°C и частоте 0,6 Гц. Данные анализировали приближением к модели 1:1 с получением констант аффинности. Программное обеспечение для сбора данных представляло собой Fortebio Data Acquisition 7.0, а программное обеспечение для анализа данных представляло собой Fortebio Data Analysis 7.0.

Константы аффинности C1q в отношении VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), а также контрольных антител ниволумаба и бевацизумаба, показаны в Таблице 6 и на ФИГ. 26-30.

Таблица 6: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их изотипов с C1q

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/c)	SE (k_{dis})	R_{max} (нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	1,14E-09	6,52E+06	5,64E+05	7,40E-03	5,58E-04	0,51-0,63
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	9,76E-10	5,73E+06	5,49E+05	5,59E-03	6,12E-04	0,32-0,51
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A указывает на отсутствие связывания антитела или крайне слабый сигнал связывания антитела с антигеном, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Согласно представленным результатам: VP101(hG1WT) может связываться с C1q с константой аффинности 9,76 x 10^{-10} M; бевацизумаб может связываться с C1q с константой аффинности 1,14 x 10^{-9} M; в то время как ниволумаб, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) не связывались или имели крайне слабый сигнал связывания с C1q, и вследствие этого результаты не были проанализированы и соответствующие данные не были получены.

Полученные результаты показывают, что, за исключением отсутствия связывания ниволумаба, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) с FcγRIIIa_F158, другие антитела связывались с C1q, при этом аффинность VP101(hG1WT) и бевацизумаба была сходной.

Пример 8: Анализ ADCC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1

Для определения ADCC-эффекта антител VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на клеточном уровне, авторы изобретения сконструировали клетки CHO-K1-PD1, экспрессирующие антиген PD-1, и разработали систему совместного культивирования нормальных человеческих PBMC и клеток-мишеней для определения ADCC-активности антител на цитологическом уровне.

Метод определения ADCC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, описан следующим образом.

В данном эксперименте сначала конструировали вектор сверхэкспрессии человеческого PD-1 pCDH-CMV-PD1FL-Puro (pCDH-CMV-Puro приобретали у Youbio), полученный вектор экспрессии упаковывали в вирус и затем инфицировали им клетки CHO-K1, получая, после внесения пуромицина (2 мкг/мл) и скрининга, стабильную клеточную линию CHO-K1-PD1, устойчивую к пуромицину и стабильно экспрессирующую мембранный белок PD-1. Нормальные человеческие PBMC выделяли в соответствии с инструкцией по выделению мононуклеарных клеток периферической крови с использованием фиколла. Выделенные PBMC ресуспендировали в полной среде 1640 и окрашивали трипановым синим, осуществляли подсчет клеток и определяли их жизнеспособность. Клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с насыщенной влажностью при 37°C и 5% CO_2. На следующий день осуществляли сбор клеток CHO-K1-PD1 и PBMC, центрифугировали их, удаляя надосадочную жидкость, и затем клеточные осадки ресуспендировали в RPMI-1640 (содержавшей 1% BSA) (называемой далее аналитической средой), центрифугировали и промывали 2 раза; осуществляли подсчет клеток и определение их жизнеспособности, концентрацию клеток корректировали до необходимого диапазона с использованием аналитической среды и суспензию клеток CHO-K1-PD1 (30000 на лунку) вносили в 96-луночный планшет в соответствии с планом эксперимента; добавляли 50 мкл антитела, тщательно перемешивали и осуществляли предварительную инкубацию на протяжении 1 ч при комнатной температуре; после предварительной инкубации к клеткам добавляли PBMC (900000/50 мкл на лунку), тщательно перемешивали и инкубировали на протяжении 4 ч

в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2. Через 4 ч 96-луночный планшет извлекали и осуществляли центрифугирование на протяжении 5 мин при 250 g; 100 мкл надосадочной жидкости осторожно переносили в новый 96-луночный микропланшет с плоским дном (не набирая в пипетку клеточный осадок). В каждую лунку вносили по 100 мкл свежеприготовленного реакционного раствора в соответствии с инструкцией к набору для определения цитотоксичности (Cytotoxicity Detection Kit). Клетки инкубировали на протяжении 30 мин при комнатной температуре в темноте. Измеряли значения OD (оптической плотности) при 490 нм и 650 нм, где значения OD каждой группы равны разности OD_{490nm} и OD_{650nm}. ADCC-активность рассчитывали для каждой группы по следующей формуле: ADCC (%) равна отношению разности группы введения и группы отрицательного контроля к разности максимального высвобождения LDH клетками-мишенями и спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями, умноженной на 100%.

Результаты определения ADCC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, выражены как % ADCC и показаны на ФИГ. 31.

Представленные результаты показывают, что положительное контрольное 14C12H1L1(G1WT) обладает значительной ADCC-активностью в системе смешанной культуры PBMC и CHO-K1-PD1, указывая на нормальное функционирование системы ADCC. По сравнению с антителом изотипического контроля hIgG1DM, VP101(hG1WT) продемонстрировало значительную ADCC-активность и дозозависимость, в то время как VP101(G1DM) не обладало ADCC-активностью. Представленные результаты показывают, что VP101(hG1DM), полученное посредством мутации VP101(hG1WT), не обладает ADCC-активностью на цитологическом уровне и его ADCC-эффект устранен.

Пример 9: Анализ CDC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1

Для определения CDC-эффекта антител VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на цитологическом уровне авторы изобретения сконструировали клетки CHO-K1-PD1, экспрессирующие антиген PD-1 (метод конструирования описан в Примере 8), и разработали систему культивирования клеток-мишеней с нормальной человеческой

сывороткой, содержащей комплемент, для определения CDC-активности антител на цитологическом уровне.

Метод определения CDC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, описан следующим образом.

В день определения активности клетки CHO-K1-PD1 собирали трипсинизацией и центрифугировали при 170 g на протяжении 5 мин; клеточные осадки ресуспендировали в RPMI-1640 (содержавшей 1% BSA) (называемой далее аналитической средой), центрифугировали повторно и промывали 2 раза; осуществляли подсчет клеток и определение их жизнеспособности, концентрацию клеток корректировали до необходимого диапазона с использованием аналитической среды и суспензию клеток CHO-K1-PD1 (30000 на лунку) вносили в 96-луночный планшет в соответствии с планом эксперимента; добавляли 50 мкл антитела, тщательно перемешивали и осуществляли предварительную инкубацию на протяжении 10 мин при комнатной температуре; после предварительной инкубации к клеткам добавляли нормальную человеческую сыворотку, содержащую комплемент (конечная концентрация 2%), 50 мкл на лунку, тщательно перемешивали и осуществляли инкубацию на протяжении 4 ч в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2. Через 4 ч клетки центрифугировали на протяжении 5 мин при 250 g; 100 мкл надосадочной жидкости осторожно переносили в новый 96-луночный планшет с плоским дном (не набирая в пипетку клеточный осадок). В каждую лунку вносили по 100 мкл свежеприготовленного реакционного раствора в соответствии с инструкцией к набору для определения цитотоксичности (Cytotoxicity Detection Kit). Клетки инкубировали на протяжении 30 мин при комнатной температуре в темноте. Измеряли значения OD при 490 нм и 650 нм, где значения OD каждой группы равны разности OD_{490nm} и OD_{650nm}. CDC-активность рассчитывали для каждой группы по следующей формуле: CDC (%) равна отношению разности группы введения и группы отрицательного контроля к разности максимального высвобождения LDH клетками-мишенями и спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями, умноженной на 100%.

Результаты определения CDC-активности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в отношении клеток CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, выражены как % CDC и показаны на ФИГ. 32.

Представленные результаты показывают, что в системе смешанной культуры с нормальной человеческой сывороткой, содержащей комплемент, и CHO-K1-PD1 % CDC антитела положительного контроля 14C12H1L1(G1WT) значимо отличался от % CDC в группе антитела изотипического контроля hIgG1DM, указывая на нормальное функционирование системы определения CDC. При эквивалентных дозах % CDC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) не продемонстрировал значимых отличий от изотипического контроля.

Пример 10: Фармакодинамическая активность VP101(hG1DM) в системе смешанной культуры (MLR) мононуклеарных клеток периферической крови и клеток Raji-PDL1

В данном эксперименте сначала конструировали вектор сверхэкспрессии человеческого PD-L1 plenti6.3-PD-L1-BSD (plenti6.3-BSD приобретали у Invitrogen), полученный вектор экспрессии упаковывали в вирус и затем инфицировали им клетки Raji, получая, после внесения и скрининга с использованием BSD (10 мкг/мл), стабильную клеточную линию Raji-PDL1, стабильно экспрессирующую мембранный белок PD-L1. Нормальные человеческие PBMC выделяли в соответствии с инструкцией по выделению мононуклеарных клеток периферической крови с использованием фиколла, и выделенные PBMC ресуспендировали в полной среде 1640, считали и замораживали. PBMC восстанавливали, добавляли SEB (энтеротоксин B *Staphylococcus aureus*) и стимулировали для культивирования на протяжении двух суток. Через двое суток клетки Raji-PDL1 в логарифмической фазе собирали, добавляли к ним митомицин C (Sigma, рабочая концентрация составляла 25 мкг/мл), осуществляли инкубацию в инкубаторе на протяжении 60 мин и клетки Raji-PDL1, обработанные митомицином C, центрифугировали и промывали; PBMC, стимулированные с использованием SEB на протяжении двух суток, собирали и промывали; эти клетки смешивали и культивировали при численном соотношении клеток 1:1 в условиях присутствия или отсутствия антител. Через 3 суток надосадочную жидкость собирали

центрифугированием и концентрации IL-2 и IFN-γ в надосадочной жидкости определяли посредством ELISA.

Результаты по секреции IFN-γ показаны на ФИГ. 33. Представленные результаты показывают, что VP101(hG1DM) может эффективно стимулировать секрецию IFN-γ и его активность существенно превышает активность ниволумаба.

Результаты по секреции IL-2 показаны на ФИГ. 34. Представленные результаты показывают, что VP101(hG1DM) может эффективно стимулировать секрецию IL-2 дозозависимым образом и его активность существенно превышает активность ниволумаба.

Пример 11: Отсутствие антителозависимой фагоцитарной активности VP101(hG1DM) в отношении PD-1-положительных клеток

Антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) означает, что Fc-фрагмент антитела, связанного с антигеном на поверхности клетки, связывается с Fc-рецептором фагоцитарно активной клетки (такой как макрофаг) и, таким образом, опосредует фагоцитоз клеток, с которыми связано антитело. Применительно к антителам-ингибиторам иммунных контрольных точек, таким как антитело к PD-1, наличие ADCP-активности будет приводить к повреждению иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, оказывающих противоопухолевый эффект посредством уничтожения опухолевых клеток, и к снижению их противоопухолевой активности.

В данном эксперименте в качестве эффекторных клеток были взяты мышиные макрофаги, а в качестве клеток-мишеней были взяты клетки линии CHO-K1-PD1, сверхэкспрессирующей PD-1 (метод конструирования которой описан в Примере 8). Определяли опосредованный клетками ADCP-эффект. В данном эксперименте для определения ADCP-активности VP101(hG1DM) в отношении клеток, экспрессирующих PD-1 была применена проточная цитометрия, и полученные результаты показывают, что VP101(hG1DM) не обладало ADCP-активностью, в то время как имеющееся в продаже антитело ниволумаб к той же самой мишени обладало значительной ADCP-активностью. Примененный метод представлял собой следующее.

Сначала осуществляли асептический забор костного мозга из бедренных костей мышей C57 (приобретенных у Guangdong Medical Laboratory Animal Center) и лизис с использованием буфера для лизиса эритроцитов на льду на протяжении 5 мин. Лизис

прекращали полной средой DMEM (содержавшей 10% FBS), лизат центрифугировали при 1000 об/мин и промывали два раза. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной среды DMEM и добавляли M-CSF в рабочей концентрации 100 нг/мл. Клетки культивировали на протяжении 7 суток при 37°C и 5% CO_2 в клеточной культуральной камере для индукции. Половину среды заменяли и M-CSF добавляли на 3 и 5 сутки. Индукцию клеток завершали на 7 сутки. Клетки расщепляли 0,25%-м трипсином. Осуществляли сбор макрофагов и центрифугировали их при 750 g на протяжении 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, клетки суспендировали в полной среде DMEM (содержавшей 10% FBS) и осуществляли их подсчет. Плотность клеток корректировали до необходимой и вносили их в 96-луночный планшет с коническим дном для последующего использования.

Сбор клеток CHO-K1-PD1 осуществляли традиционными методами, центрифугировали их при 170 g на протяжении 5 мин, ресуспендировали, осуществляли их подсчет и определяли их жизнеспособность. Клетки промывали один раз с использованием PBS. Сукцинимидиловый эфир диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE) разводили до 2,5 мкМ с использованием PBS, клетки ресуспендировали подходящим количеством разведенного CFSE (плотность окраски 10000000 клеток/мл) и инкубировали в инкубаторе на протяжении 20 мин. Для остановки окрашивания добавляли 6 мл полной среды DMEM (содержавшей 10% FBS). Клетки центрифугировали при 170 g на протяжении 5 мин и надосадочную жидкость удаляли; добавляли 1 мл полной среды DMEM. Клетки инкубировали в инкубаторе на протяжении 10 мин. Антитела разводили полной средой DMEM до 20 мкг/мл, 2 мкг/мл и 0,2 мкг/мл (рабочие концентрации составляли 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл) и подготавливали антитела изотипического контроля hIgG1DM и hIgG4. Свежеиндуцированные зрелые макрофаги собирали, центрифугировали при 750 g на протяжении 5 мин и надосадочную жидкость удаляли; клетки считали, переносили в 96-луночный планшет с коническим дном, осуществляли центрифугирование при 1000 g и надосадочную жидкость удаляли; плотность клеток CHO-K1-PD-1-CFSE корректировали; разведенные антитела и клетки-мишени смешивали в соответствии с планом эксперимента в соотношении 50 мкл : 50 мкл в 96-луночном планшете с коническим дном, содержавшем макрофаги. Клетки ресуспендировали, тщательно

перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 37°C на протяжении 2 ч. В каждую лунку добавляли по 150 мкл 1% PBSA обычной температуры, осуществляли центрифугирование при 1000 g на протяжении 5 мин и надосадочную жидкость удаляли; клетки промывали один раз с использованием 200 мкл PBSA; антитело против мышиного/человеческого CD11b с APC (500-кратное разведение в PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл на образец, тщательно перемешивали и осуществляли инкубацию на льду на протяжении 40 мин. В каждую лунку добавляли по 150 мкл 1% PBSA, осуществляли центрифугирование при 1000 g на протяжении 5 мин и надосадочную жидкость удаляли; каждую лунку промывали один раз с использованием 200 мкл PBSA. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования с последующим анализом на проточном цитометре Beckman.

В данной системе макрофаги были APC-положительны, а макрофаги, вовлеченные в фагоцитоз, были APC- и CFSE-положительны. Показатель фагоцитоза определяли как отношение числа клеток с двойным положительным фенотипом к числу APC-положительных клеток и оценивали антителозависимую ADCP-активность. В каждой группе ADCP-активность, представленную как P%, рассчитывали по следующим формулам:

$$P\% = \frac{\text{число макрофагов, вовлеченных в фагоцитоз}}{\text{общее число макрофагов}} \times 100\%.$$

Полученные результаты показаны на ФИГ. 35.

Согласно представленным результатам, ниволумаб оказывал значительный ADCP-эффект в системе с макрофагами и CHO-K1-PD1, в случае VP101(hG1DM) показатель фагоцитоза был сопоставим с антителом изотипического контроля, указывая на отсутствие ADCP-эффекта у VP101(hG1DM). Эти результаты показывают, что VP101(hG1DM), вероятно, обладает лучшим противоопухолевым эффектом.

Несмотря на подробное описание конкретных воплощений настоящего изобретения, специалистам в данной области будет ясно, что, применительно к подробностям всех раскрытых идей, возможны различные модификации и замены, и что эти изменения входят в объем охраны настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определен приложенной формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее:

первую белковую функциональную область, направленную на PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1-го типа); и

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA (фактор роста эндотелия сосудов А);

где первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело; или первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин;

где

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1(определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи)-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1(определяющая комплементарность область 1 легкой цепи)-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно;

или,

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в

SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно;

где иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин подтипа IgG1;

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237 и константа аффинности биспецифического антитела в отношении FcγRIIIa и/или C1q снижена после мутации по сравнению с соответствующей константой до мутации; предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

2. Биспецифическое антитело по п. 1, где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

3. Биспецифическое антитело, содержащее:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело; или первая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело и вторая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин;

где

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями,

представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно;

или,

применительно к иммуноглобулину, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34-36, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:37-39, соответственно; применительно к одноцепочечному антителу, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:28-30, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:31-33, соответственно;

иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин подтипа IgG1;

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A.

4. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-3, где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну или более чем одну мутацию, выбранную из:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S,

H268A, E318A и K320A.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, где

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:9 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:17;

или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:9 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3.

6. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-5, выбранное из любого из следующих (1)-(12):

(1)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:7;

(2)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3;

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

(3)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:17;

(4)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:7;

(5)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:11;

(6)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность

вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:3; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:17;

(7)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(8)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:11; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(9)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:5, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(10)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3;

(11)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:11; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3; и

(12)

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:9, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:17; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:1, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:3.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-6, где

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:24 и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:26.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-7, где иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с FcγRI с константной аффинности менее чем приблизительно 10^{-6} M, такой как менее чем приблизительно 10^{-7} M, 10^{-8} M или 10^{-9} M или менее; предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C1q с константной аффинности менее чем приблизительно 10^{-9} M, такой как менее чем приблизительно 10^{-7} M, 10^{-8} M или 10^{-9} M или менее; предпочтительно, константа аффинности измерена посредством системы Octet от Fortebio.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-9, где первая белковая функциональная область связана со второй белковой функциональной областью непосредственно или через линкерный фрагмент; и/или вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела непосредственно или через линкерный фрагмент.

11. Биспецифическое антитело по п. 10, где линкерный фрагмент представляет собой (GGGGS)n, где n представляет собой положительное целое число; предпочтительно, n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

12. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-11, где каждое из числа первых белковых функциональных областей и числа вторых белковых функциональных областей независимо составляет 1, 2 или более.

13. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-12, где одноцепочечное антитело связано с C-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

14. Биспецифическое антитело, содержащее:

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

вторую белковую функциональную область, направленную на VEGFA;

где число первых белковых функциональных областей составляет 1 и число вторых белковых функциональных областей составляет 2;

первая белковая функциональная область представляет собой иммуноглобулин и вторая белковая функциональная область представляет собой одноцепочечное антитело;

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:24 и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представлена в SEQ ID NO:26;

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представлена в SEQ ID NO:9 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела

представлена в SEQ ID NO:17;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая белковая функциональная область связана со второй белковой функциональной областью через первый линкерный фрагмент; и вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются одинаковыми или разными;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента независимо выбраны из SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:19;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO:18.

15. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14.

16. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 15.

17. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 15 или вектор по п. 16.

18. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгированную группировку, где иммуноглобулин представляет собой биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14 и конъюгированная группировка представляет собой выявляемую метку; предпочтительно, конъюгированная группировка представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

19. Набор, содержащий биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14 или конъюгат по п. 18,

где, предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, способное специфично распознавать иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент; возможно, второе антитело дополнительно содержит выявляемую метку, например радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

20. Применение биспецифического антитела по любому из пп. 1-14 или

конъюгата по п. 18 в изготовлении набора для определения присутствия или уровня PD-1 и/или VEGFA в образце.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14 или конъюгат по п. 18, возможно, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

22. Применение биспецифического антитела по любому из пп. 1-14 или конъюгата по п. 18 в изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR(рецептор эпидермального фактора роста)- и/или ALK(киназа анапластической лимфомы)-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

23. Способ лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по любому из пп. 1-14 или конъюгата по п. 18; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки

матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

24. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14 для применения в лечении и/или предупреждении злокачественной опухоли; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

25. Конъюгат по п. 18 для применения в лечении и/или предупреждении злокачественной опухоли; предпочтительно, злокачественная опухоль выбрана из рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака яичника, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) и дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиального рака, мезотелиомы, эндометриального рака, аденокарциномы желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального перехода и лейкоза;

предпочтительно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого; предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого представляет собой EGFR- и/или ALK-чувствительный мутантный немелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно, рак печени представляет собой печеночноклеточный рак;

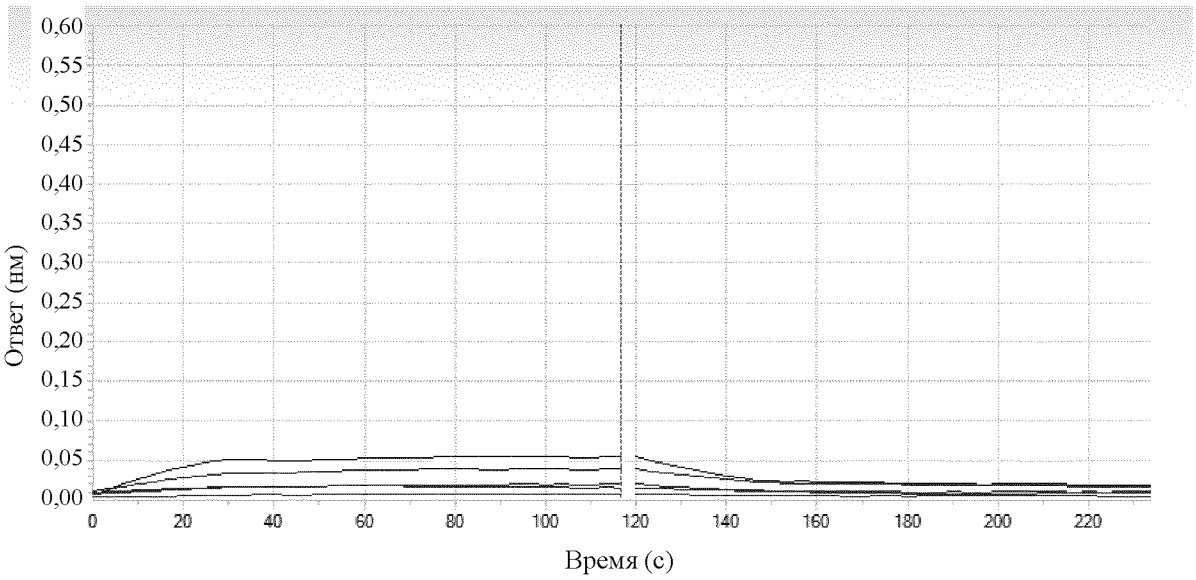
предпочтительно, опухоль почки представляет собой почечноклеточный рак;

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом;

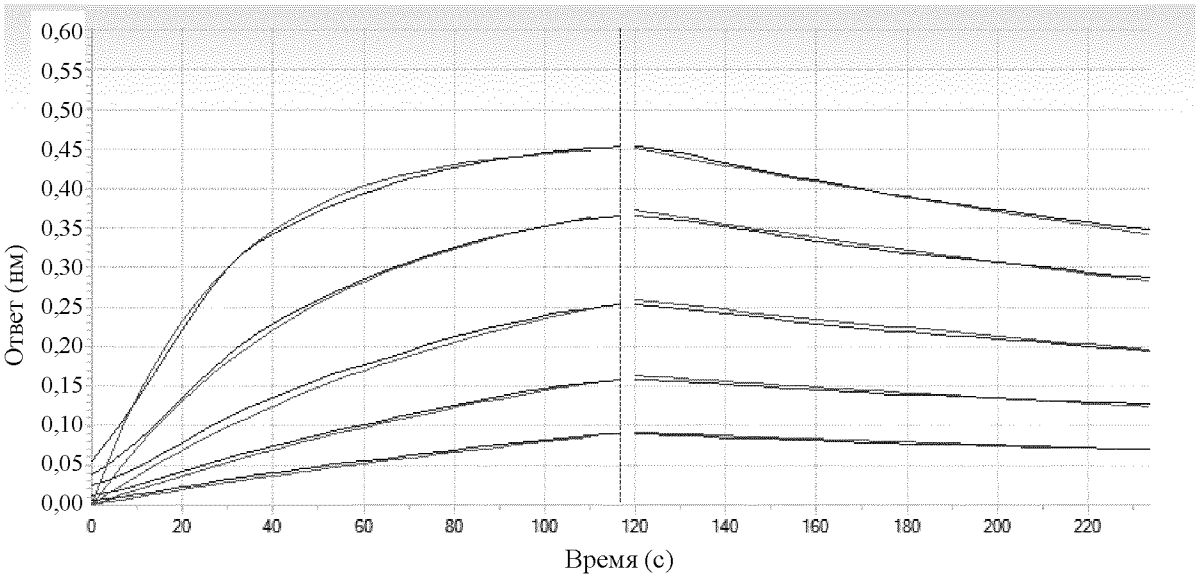
предпочтительно, уротелиальный рак представляет собой рак мочевого пузыря.

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

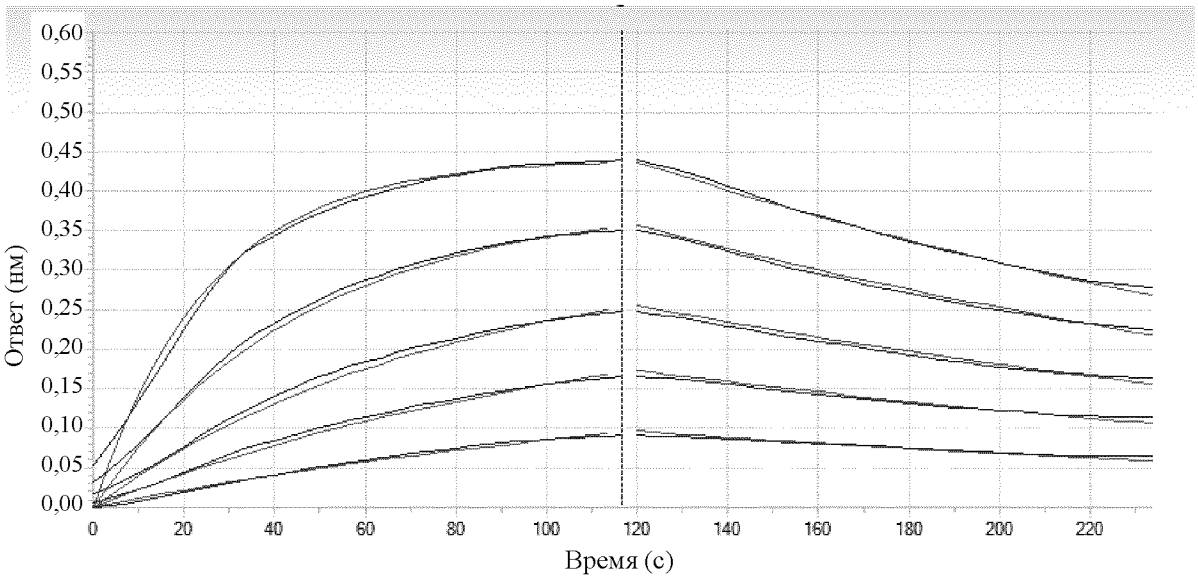
ФИГ. 1



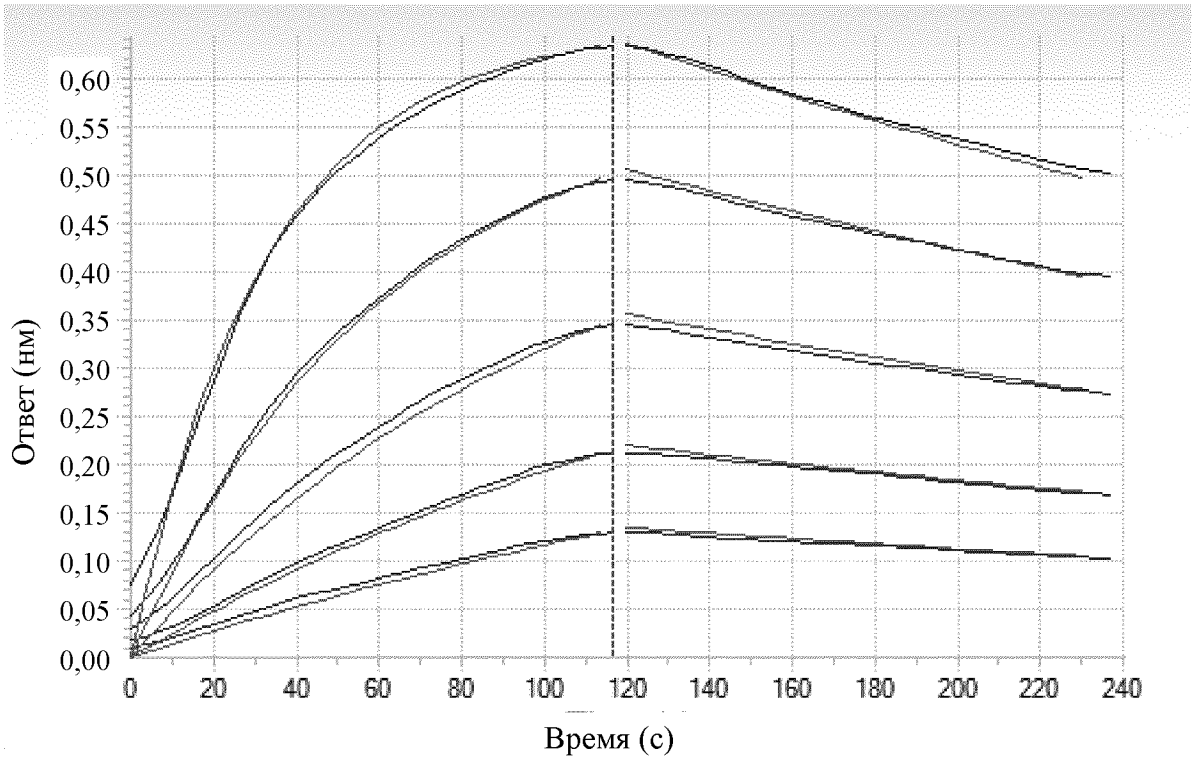
ФИГ. 2



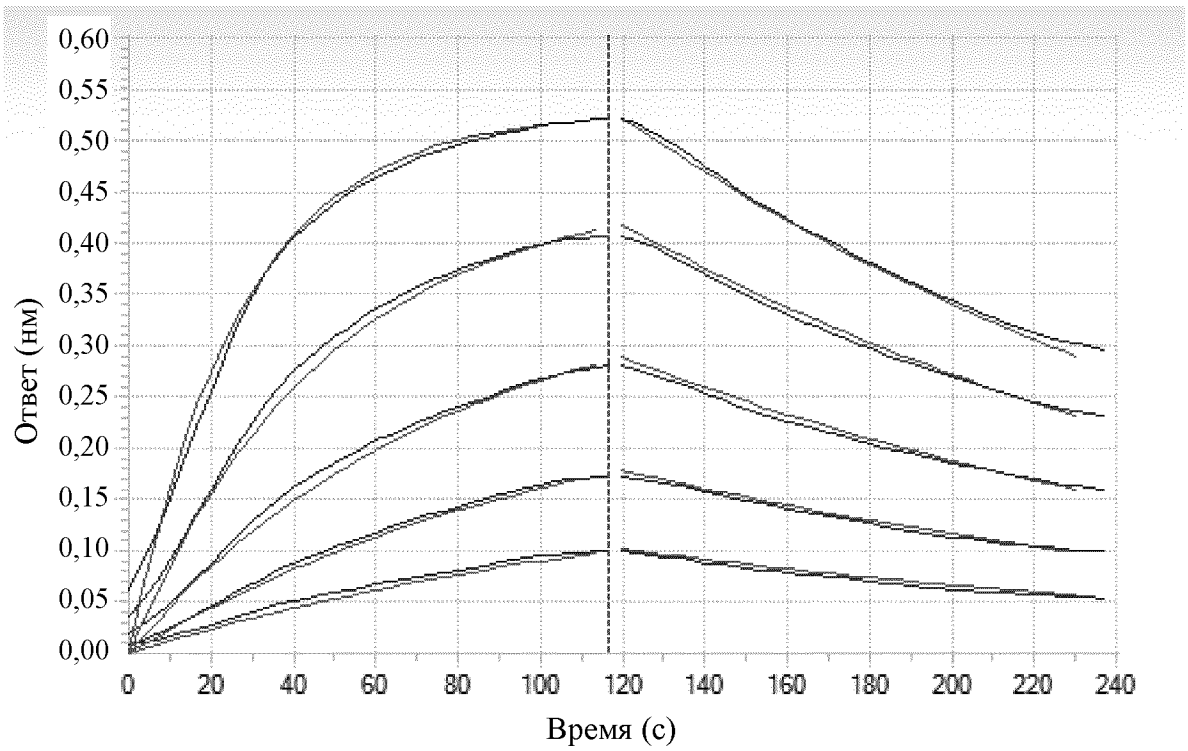
ФИГ. 3


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Время (с)

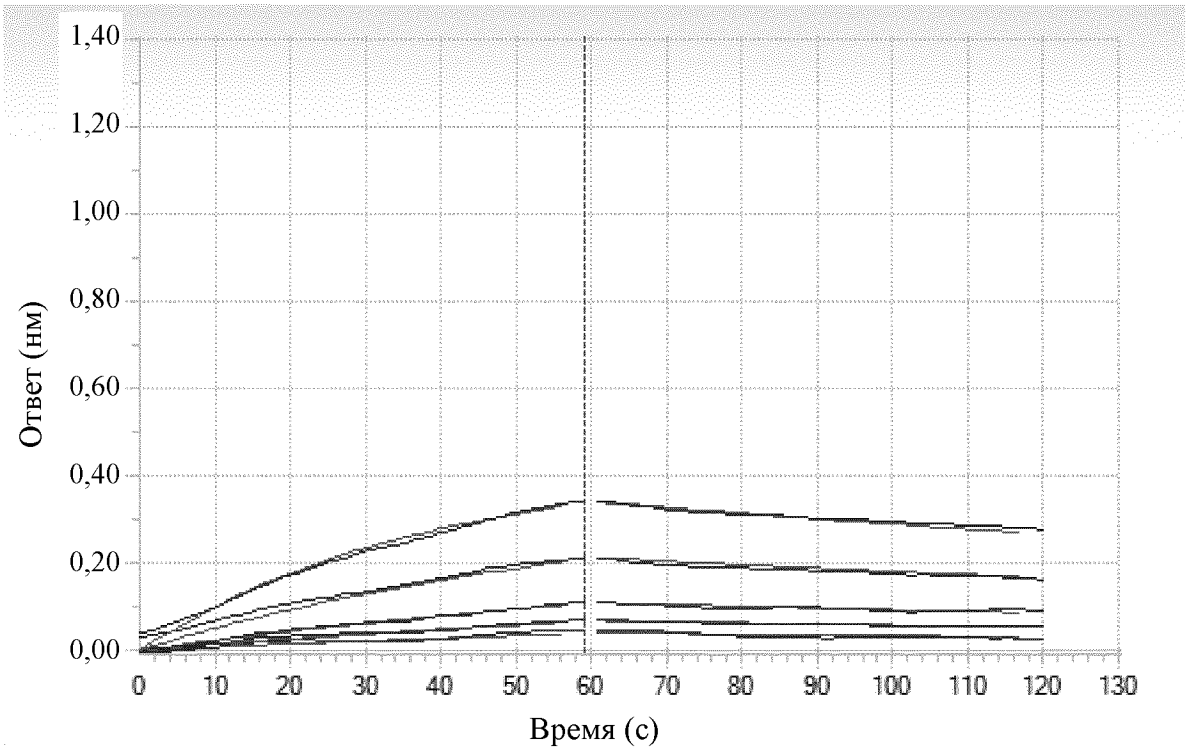
ФИГ. 4


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Время (с)

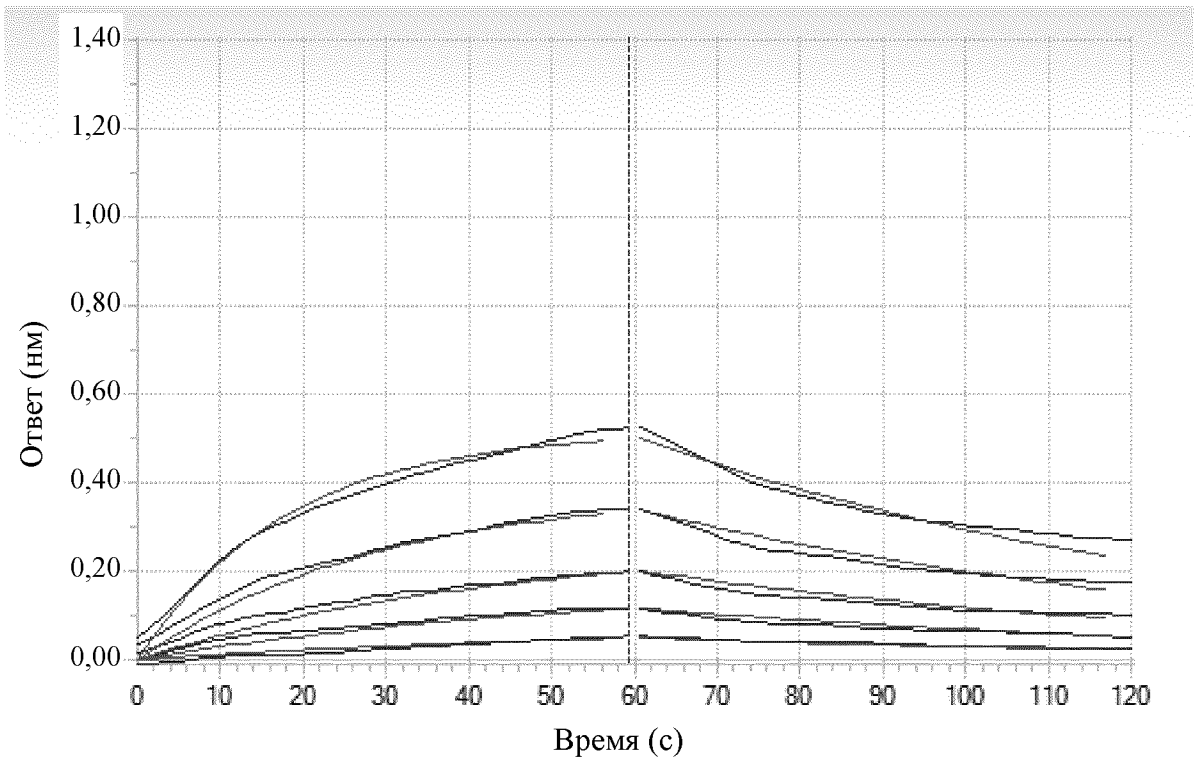
ФИГ. 5


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Время (с)

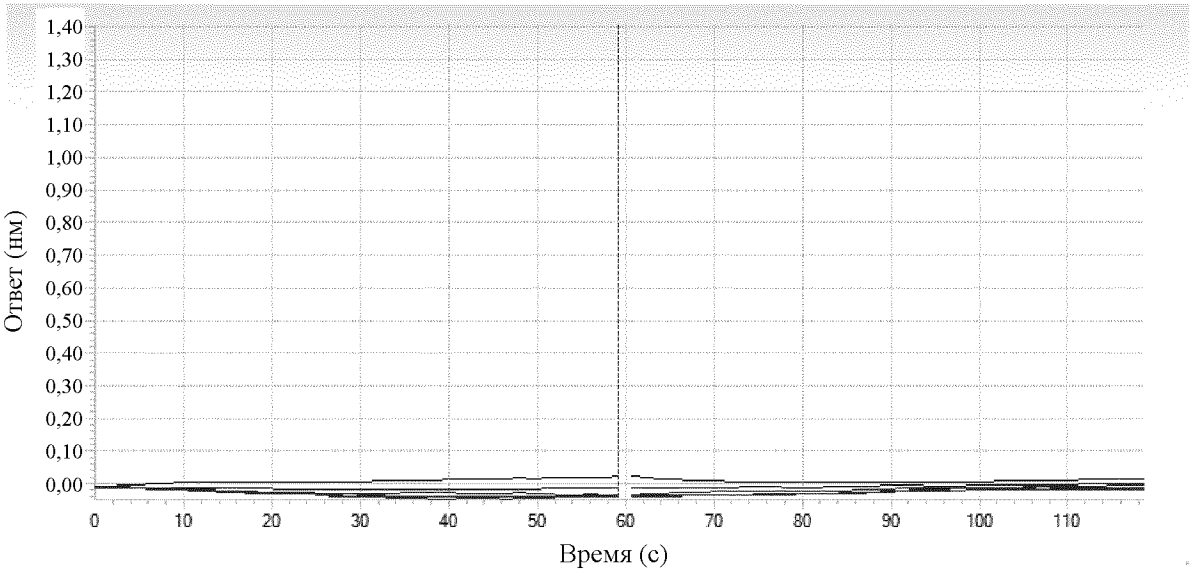
ФИГ. 6


1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

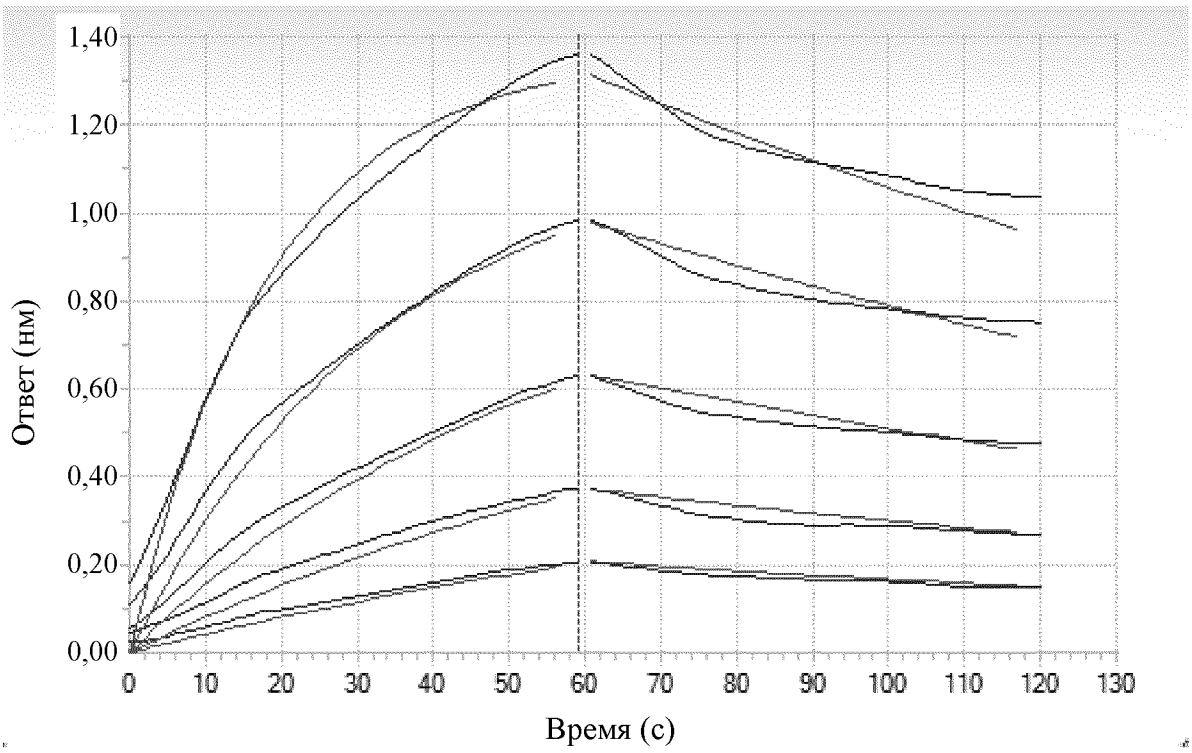
ФИГ. 7


1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Время (с)

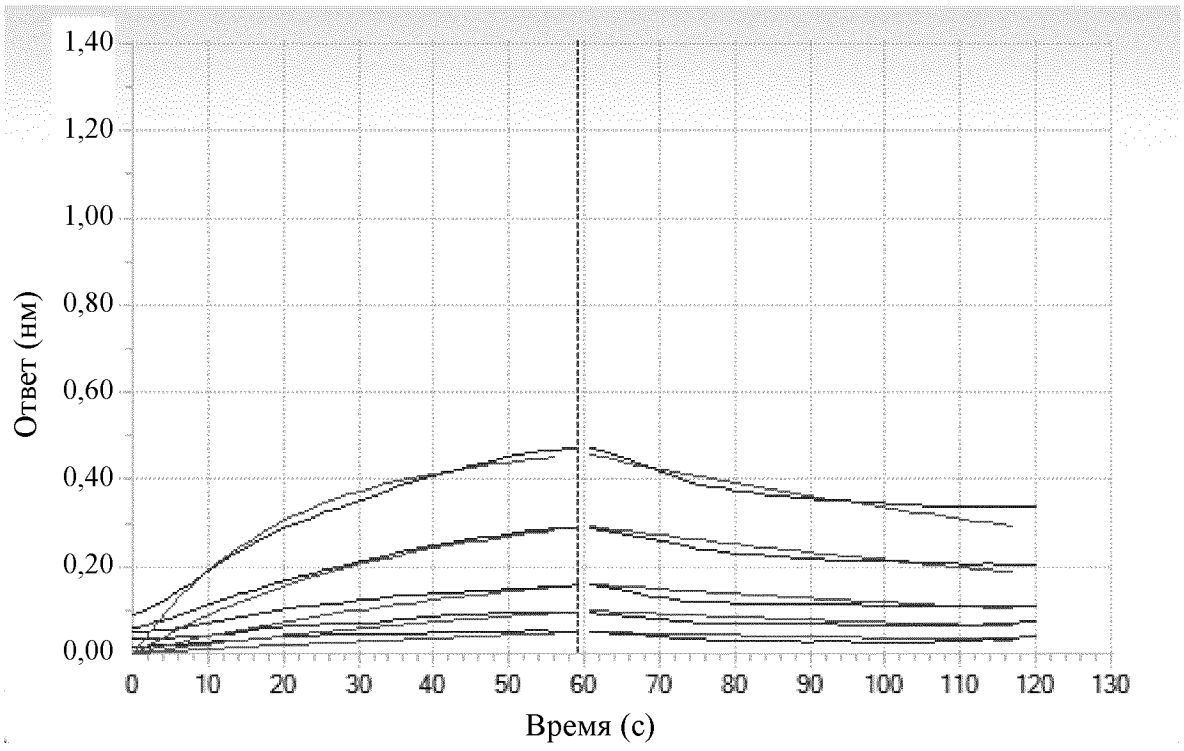
ФИГ. 8


1,40
1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

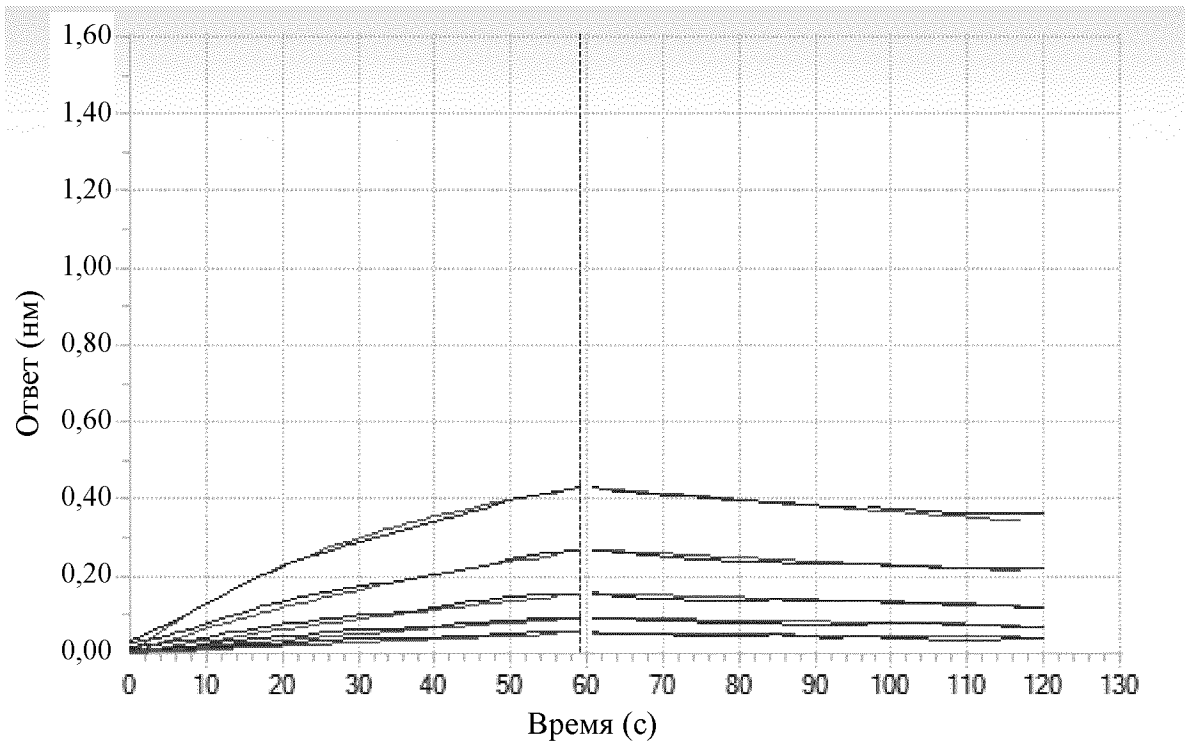
ФИГ. 9


1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

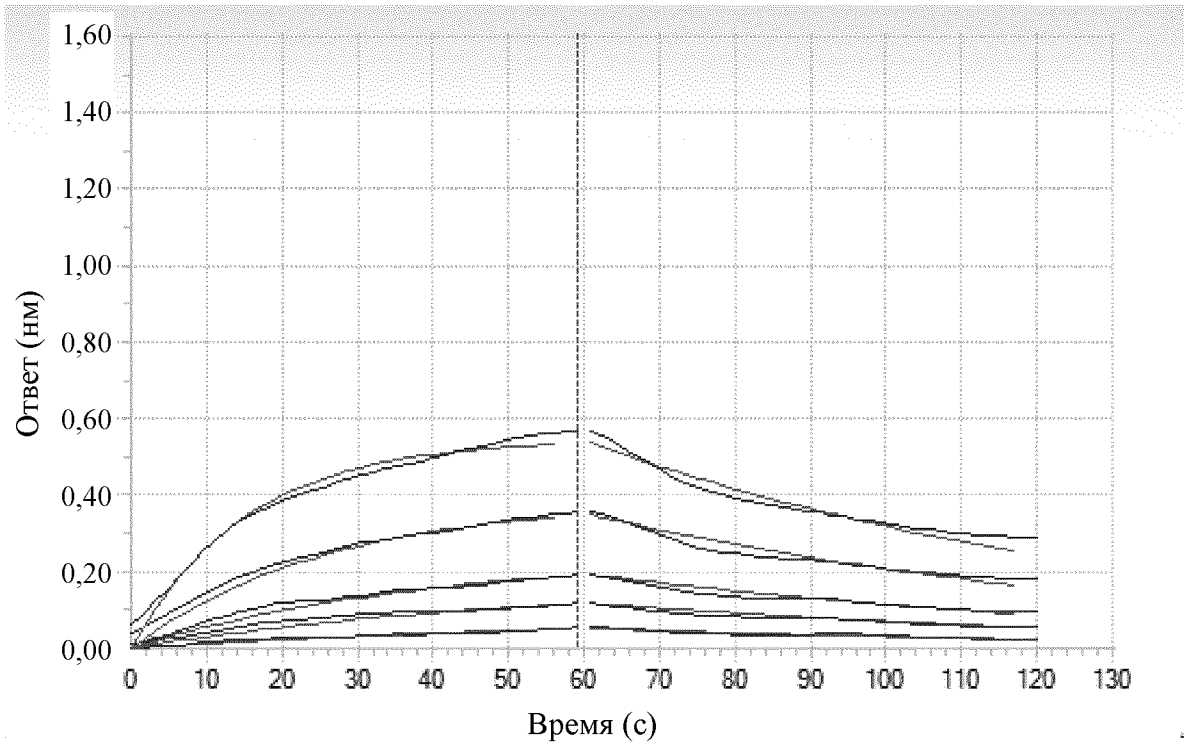
ФИГ. 10


1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

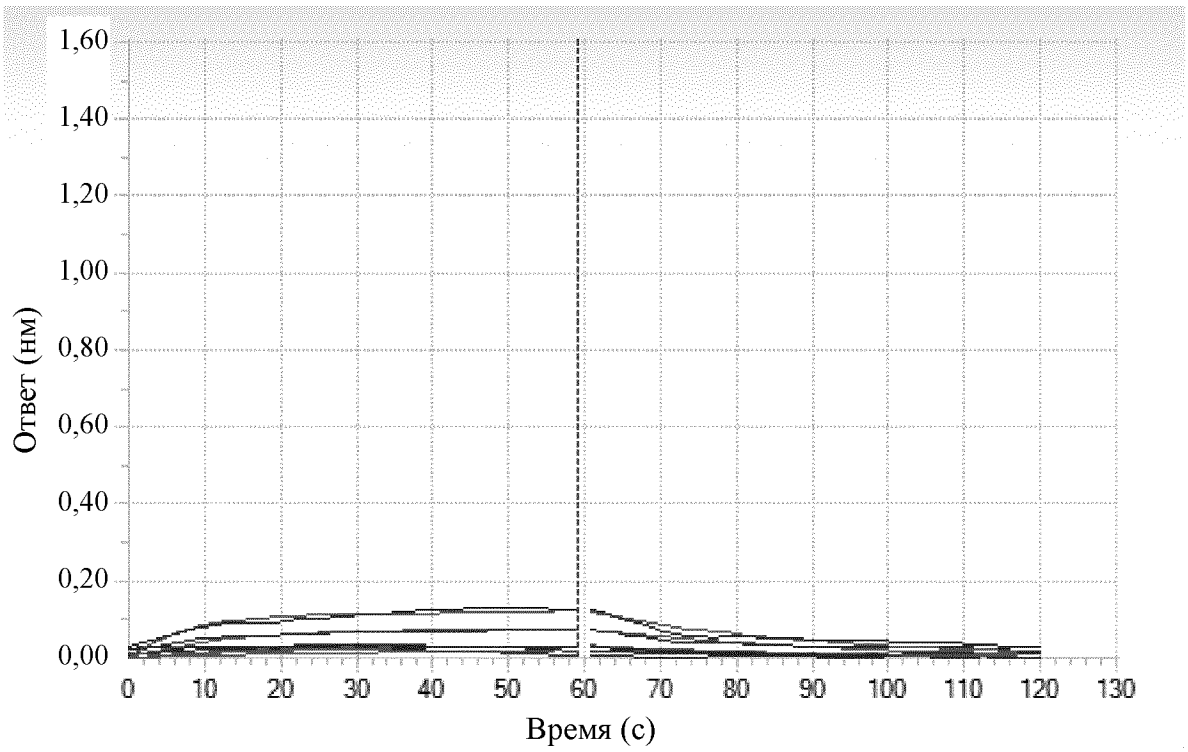
ФИГ. 11


1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

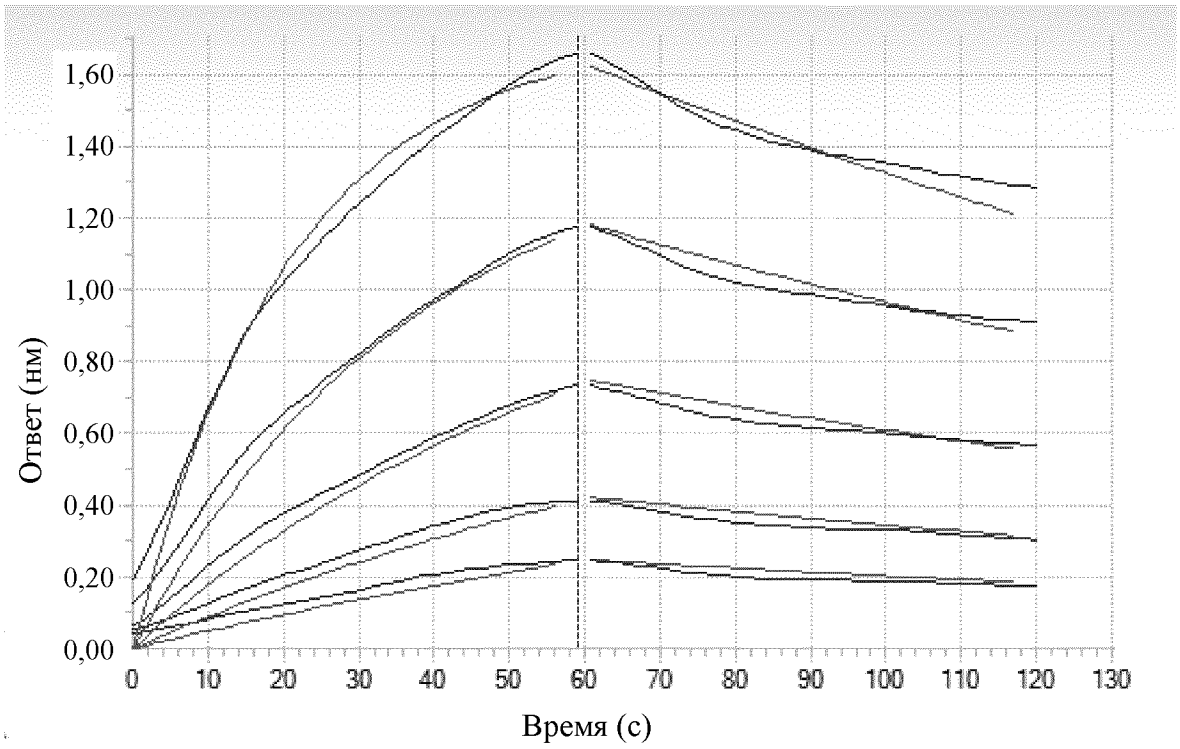
ФИГ. 12


1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

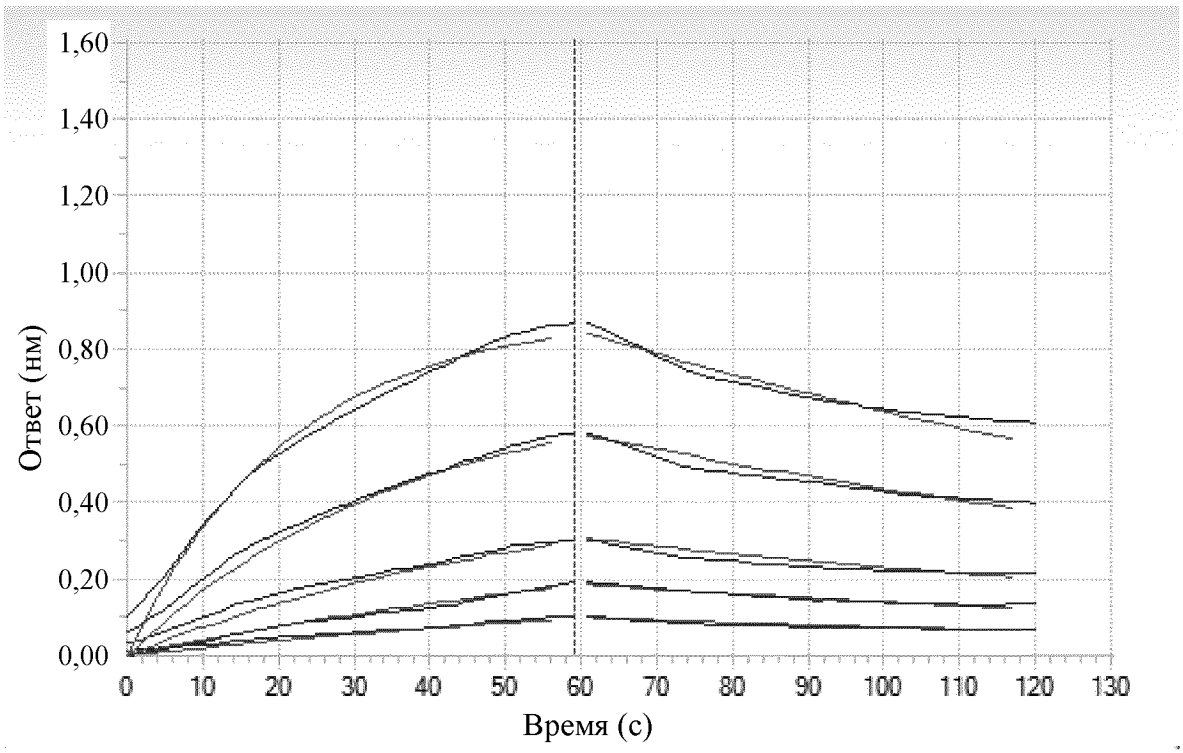
ФИГ. 13


1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

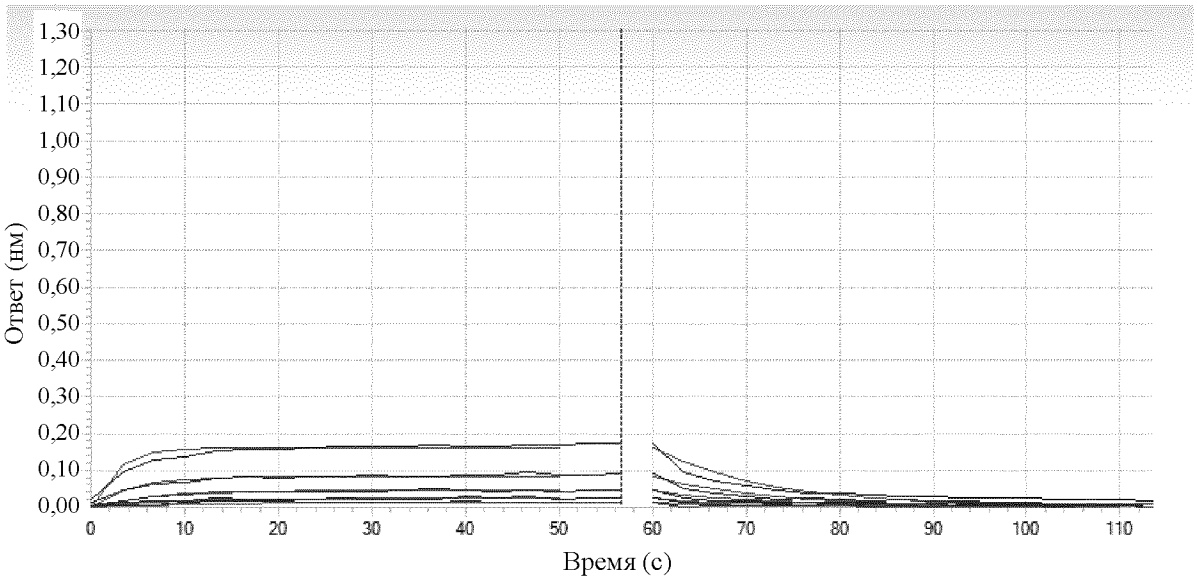
ФИГ. 14


1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

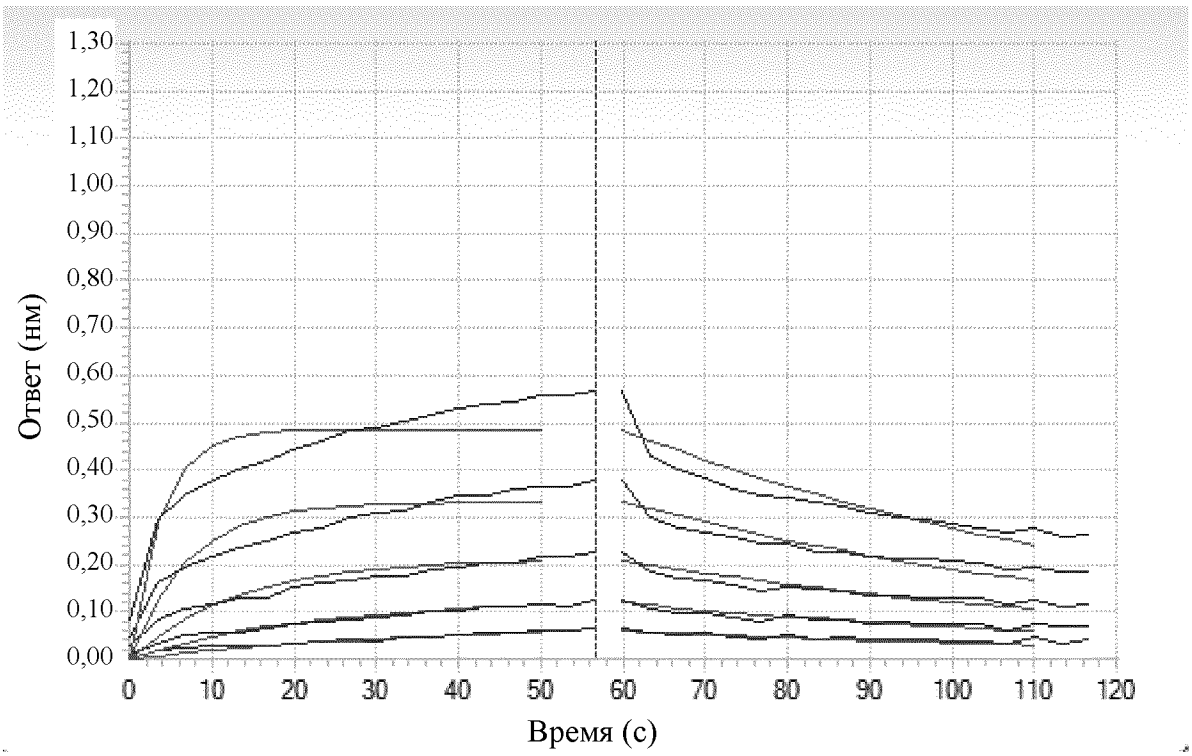
ФИГ. 15


1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

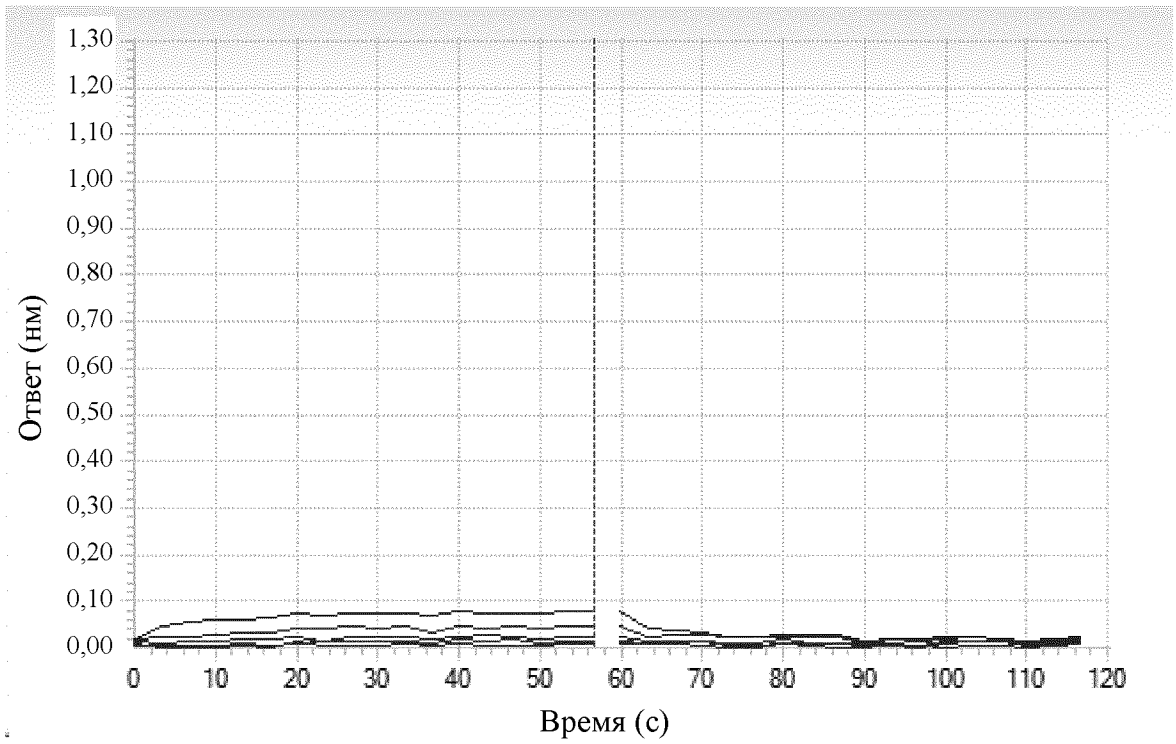
ФИГ. 16


1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

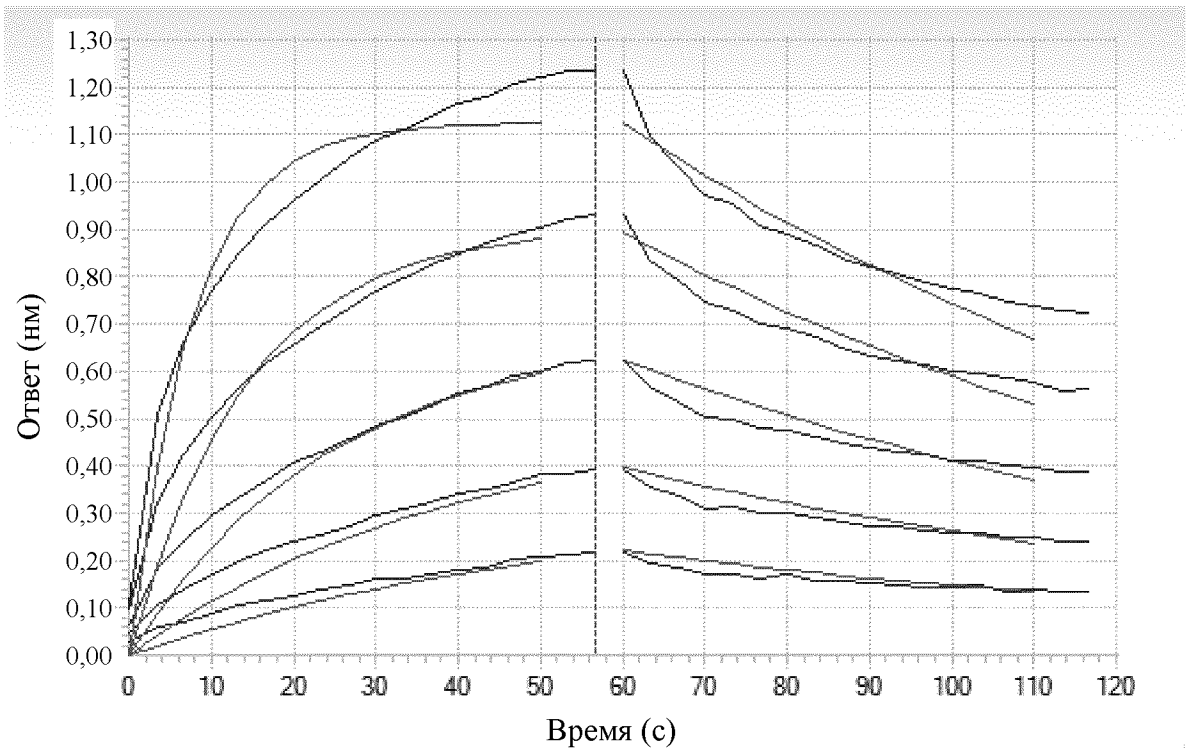
ФИГ. 17


Ответ (нм)
1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Время (с)

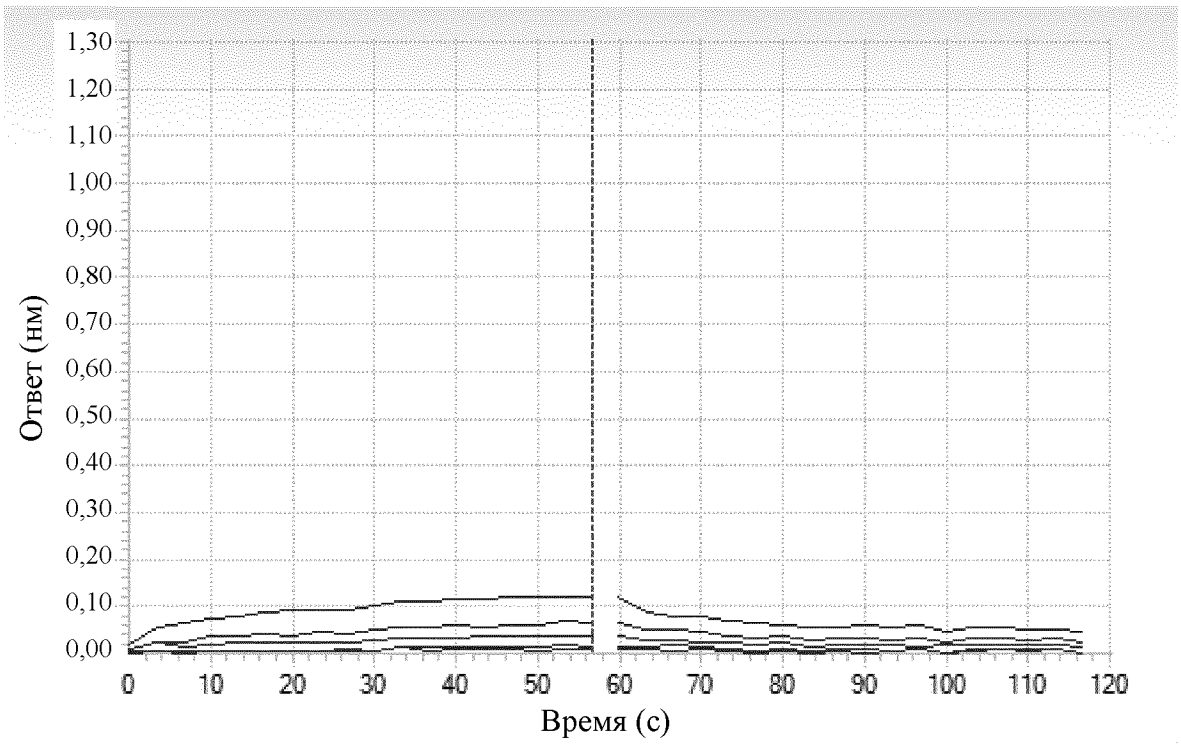
ФИГ. 18


Ответ (нм)
1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Время (с)

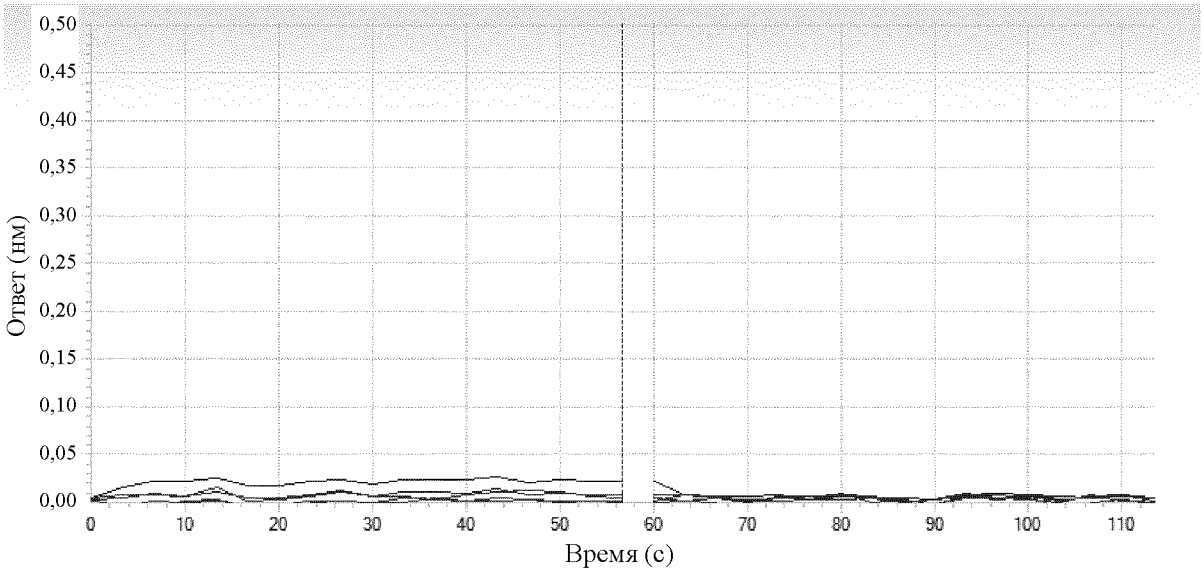
ФИГ. 19


Ответ (нм)
1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Время (с)

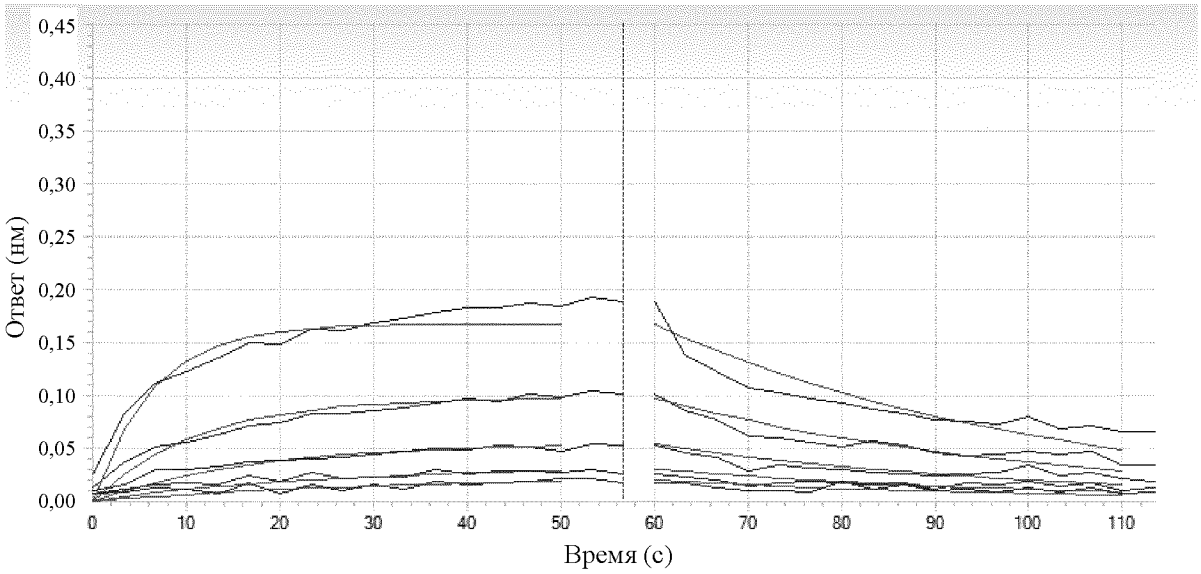
ФИГ. 20


Ответ (нм)
1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Время (с)

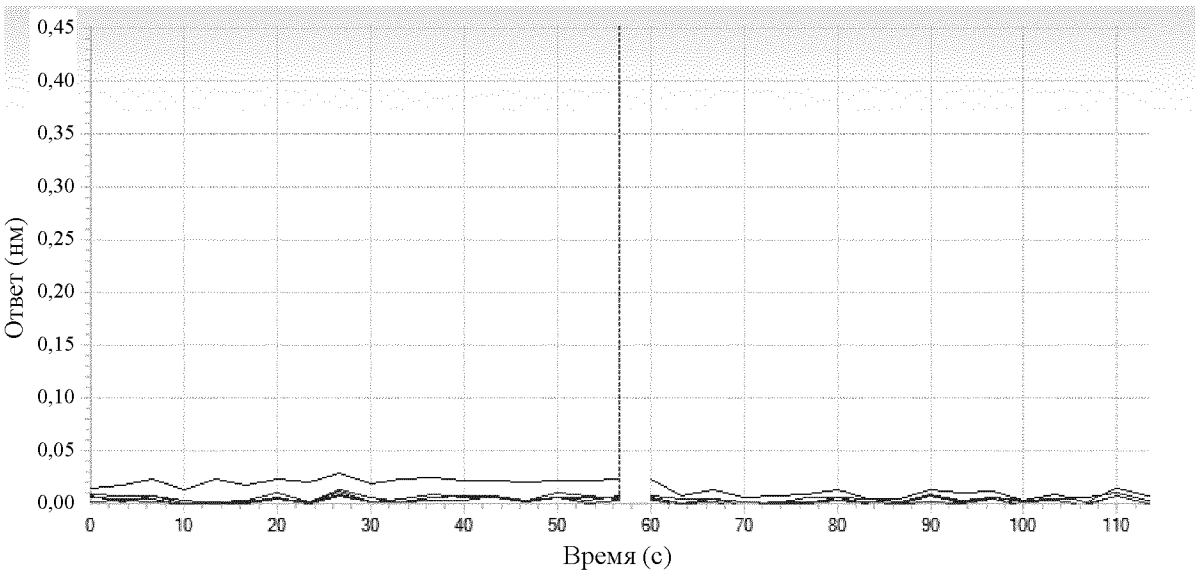
ФИГ. 21


0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

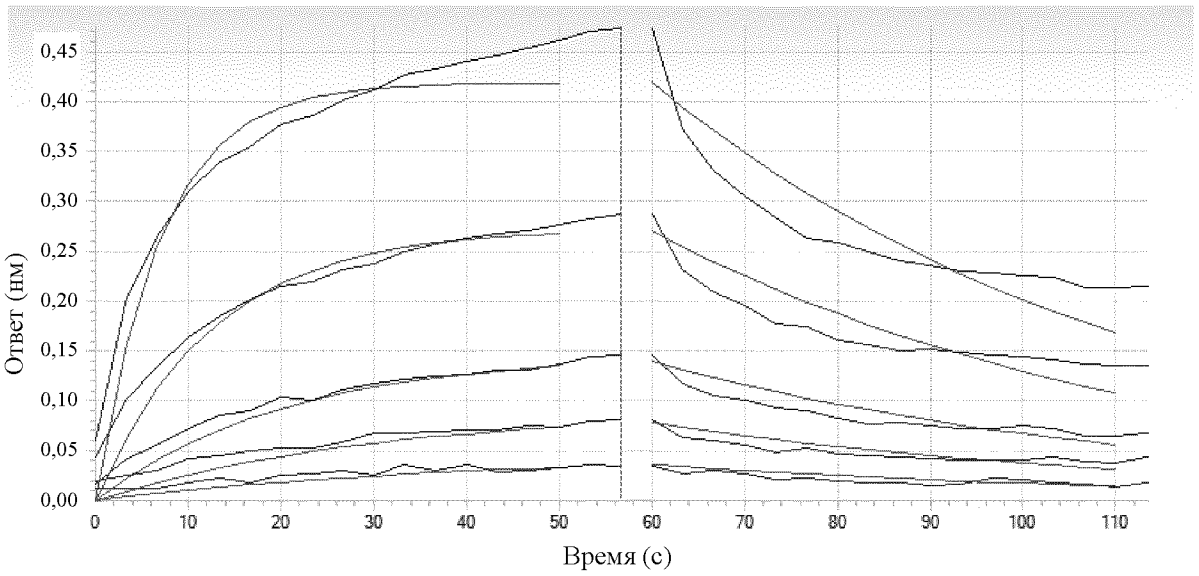
ФИГ. 22


0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

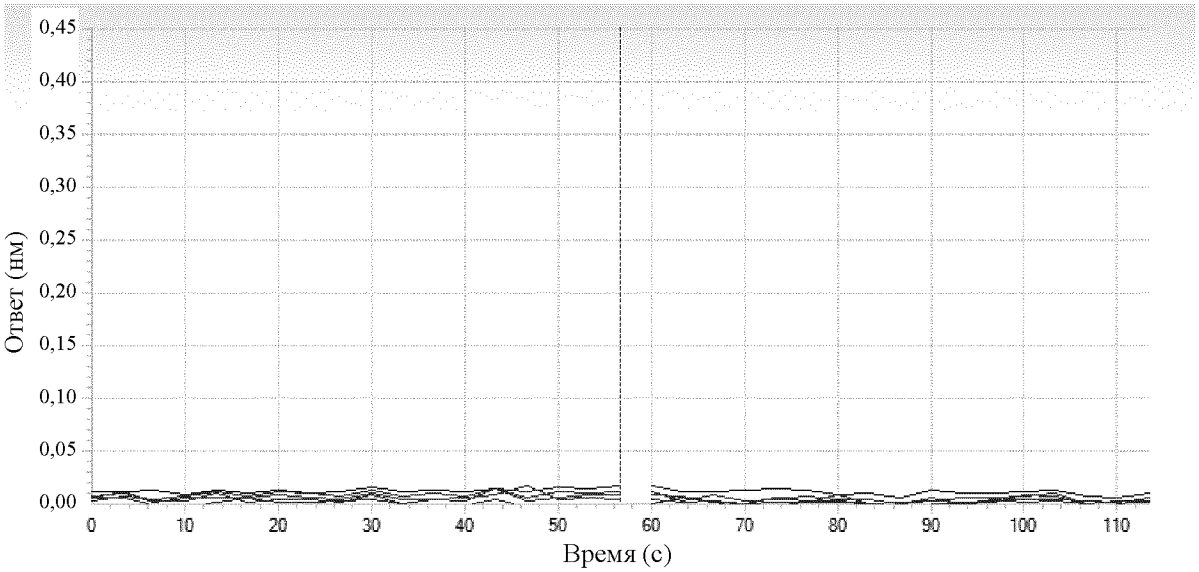
ФИГ. 23


0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

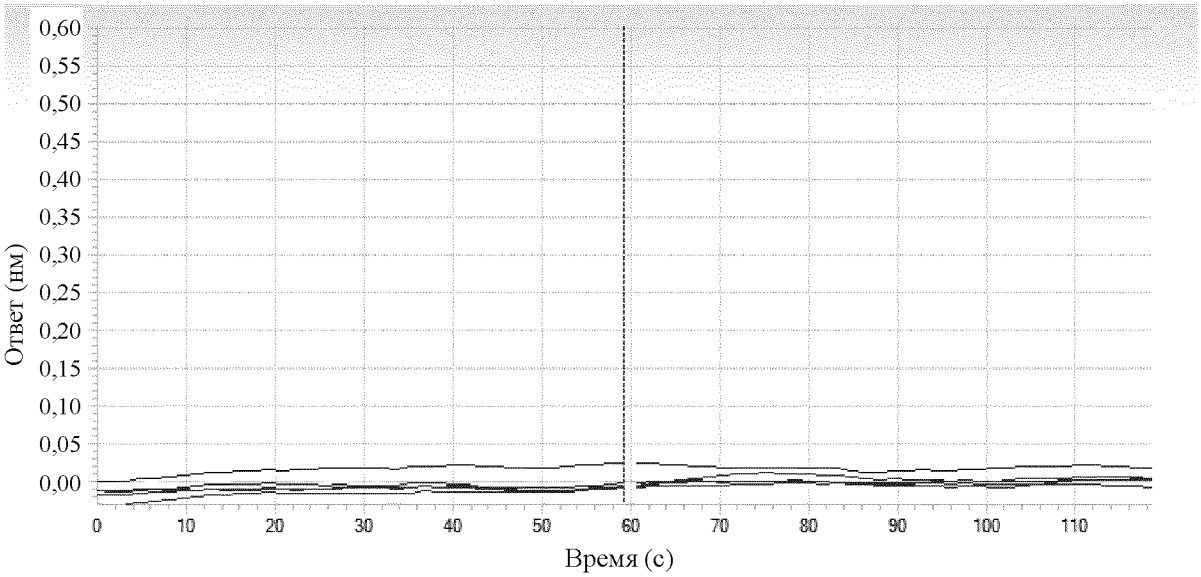
ФИГ. 24


0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

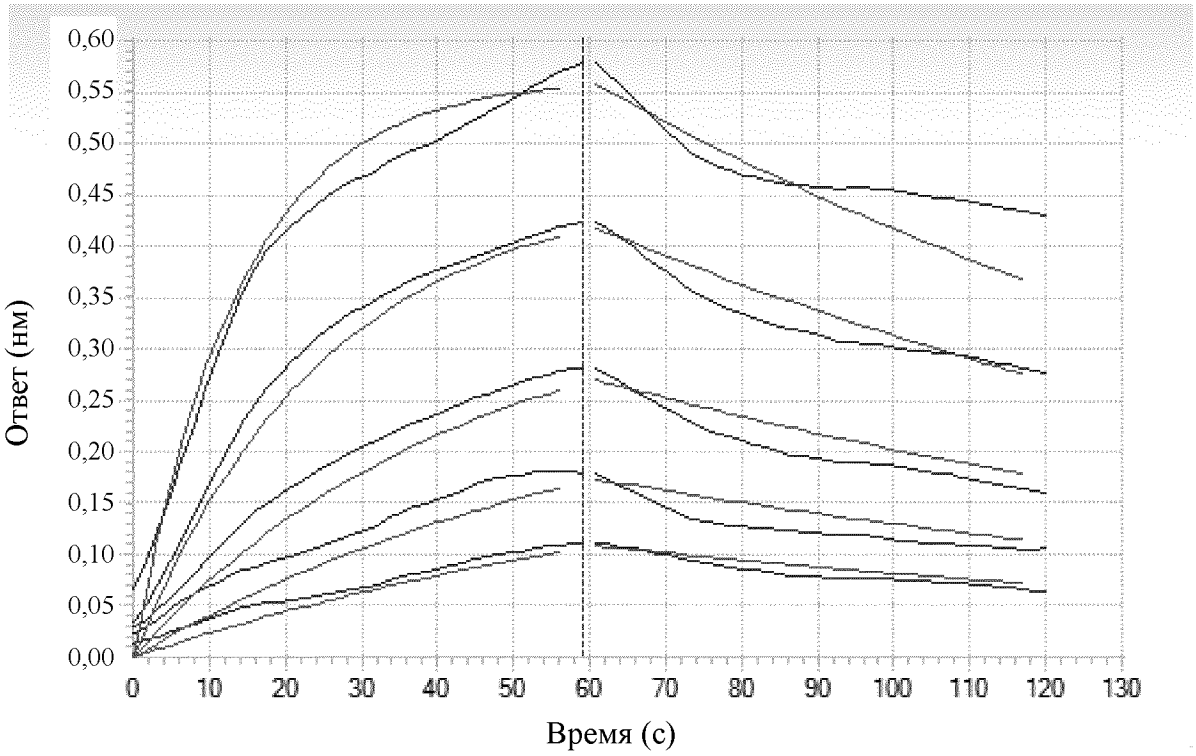
ФИГ. 25


0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

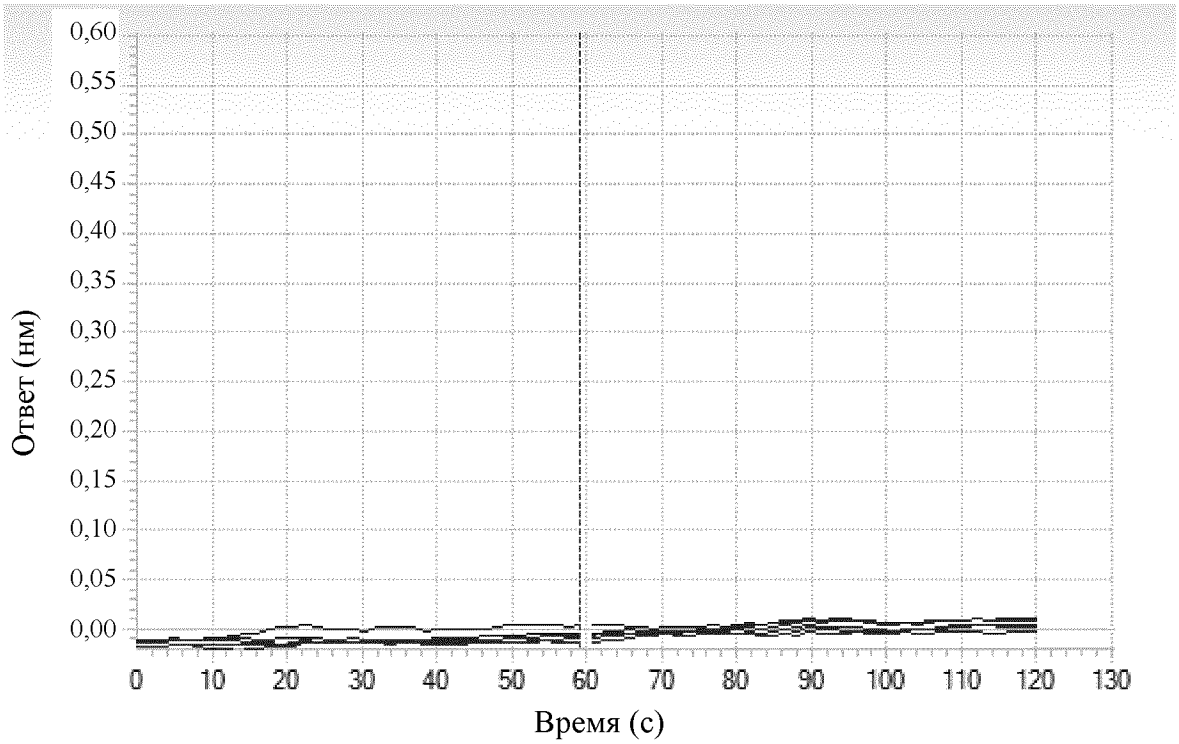
ФИГ. 26


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Время (с)

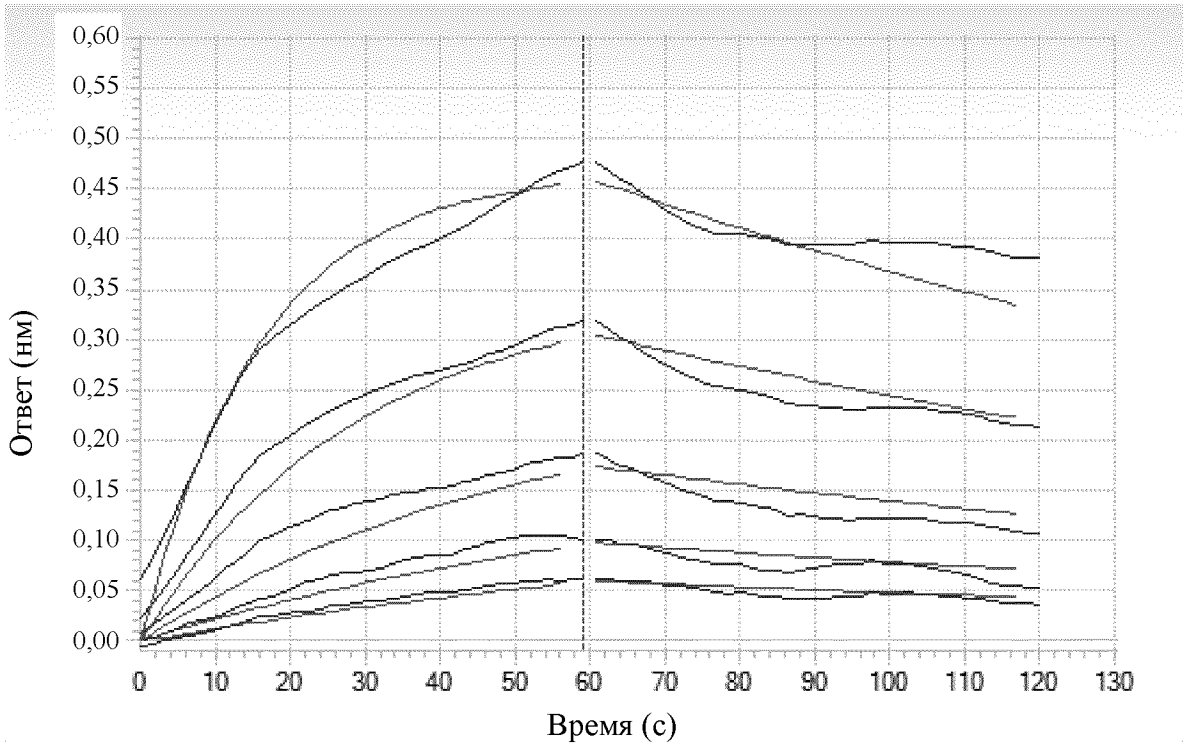
ФИГ. 27


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

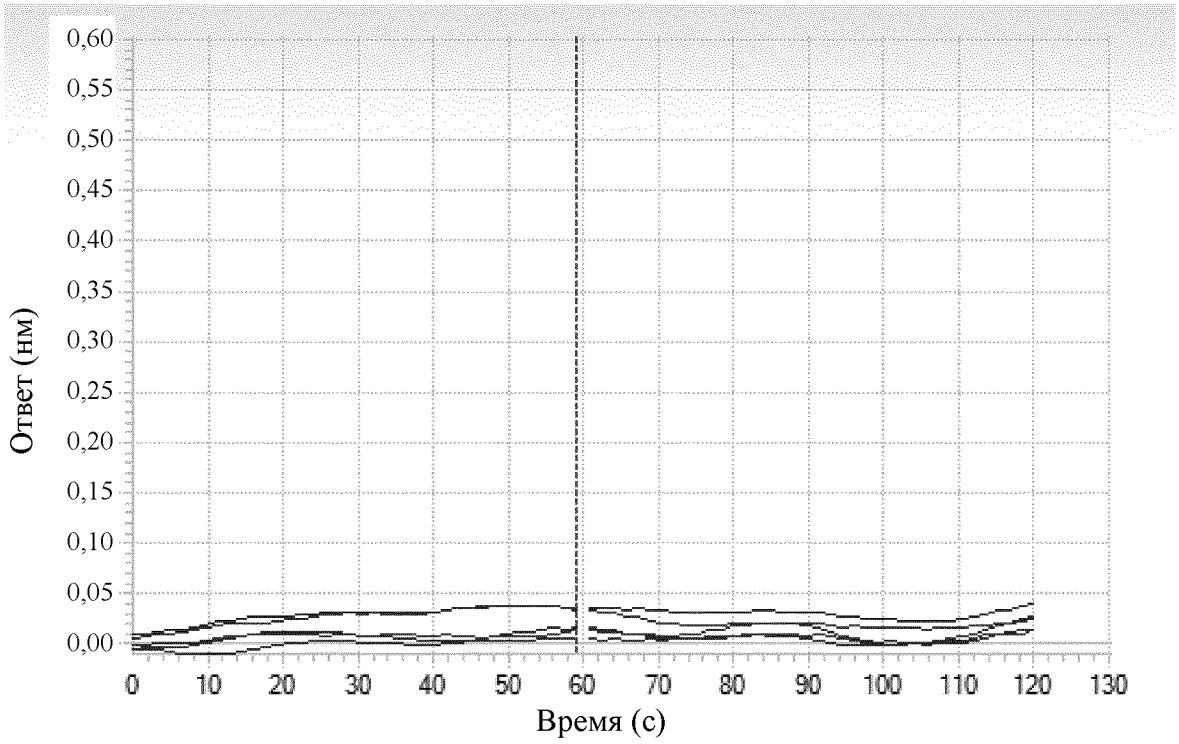
ФИГ. 28


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

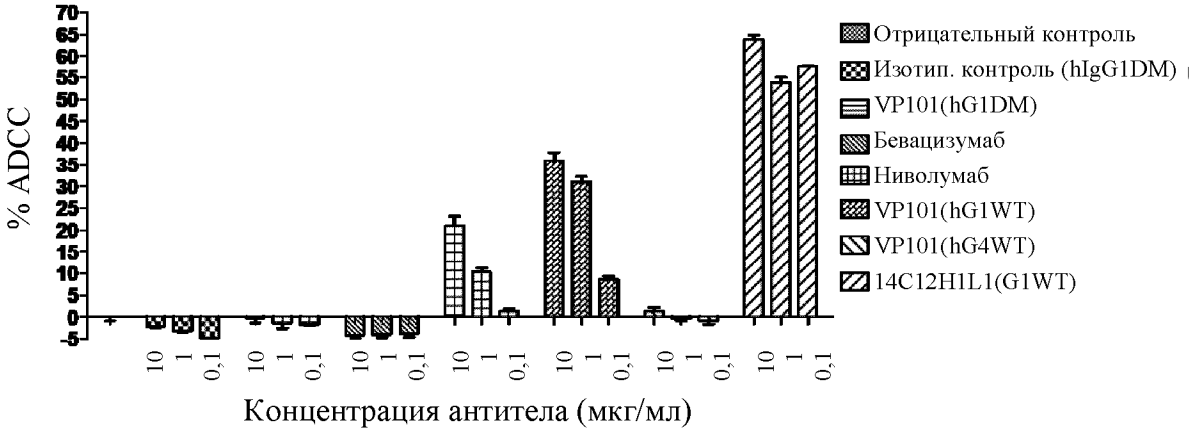
ФИГ. 29


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

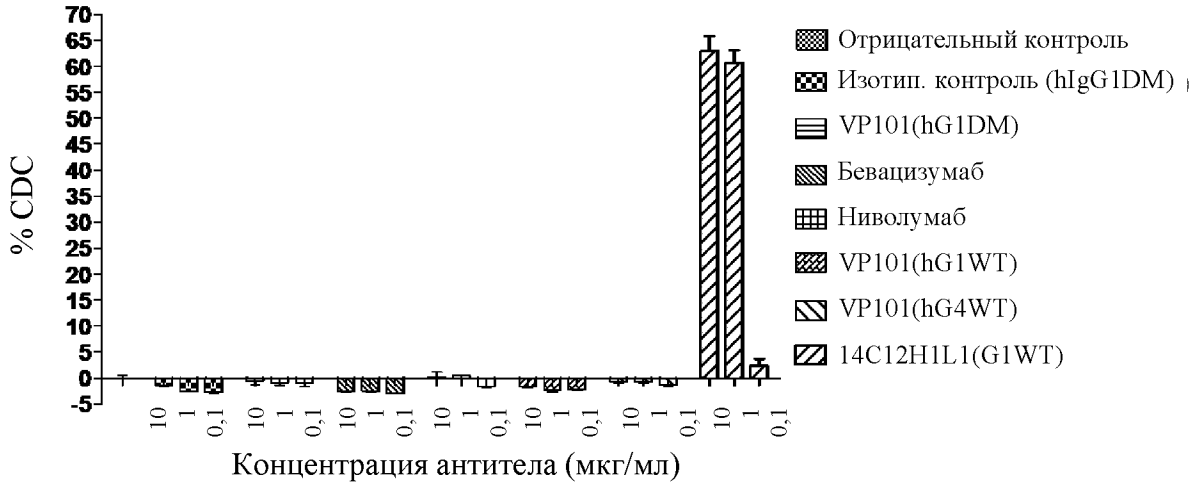
ФИГ. 30


0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Ответ (нм)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Время (с)

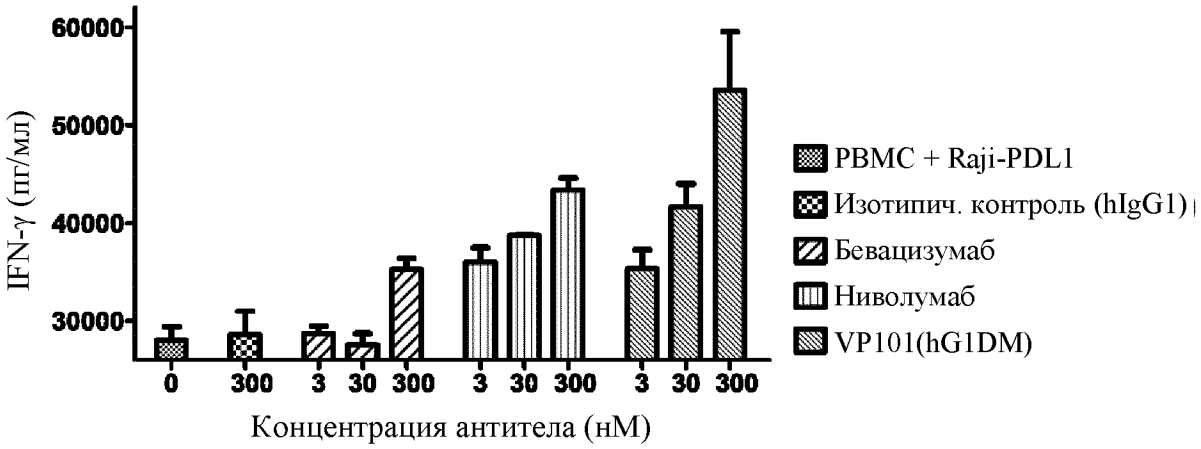
ФИГ. 31


% ADCC
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
10
1
0,1
Концентрация антитела (мкг/мл)
Отрицательный контроль
Изотип. контроль (hIgG1DM)
VP101(hG1DM)
Бевацизумаб
Ниволумаб
VP101(hG1WT)
VP101(hG4WT)
14C12H1L1(G1WT)

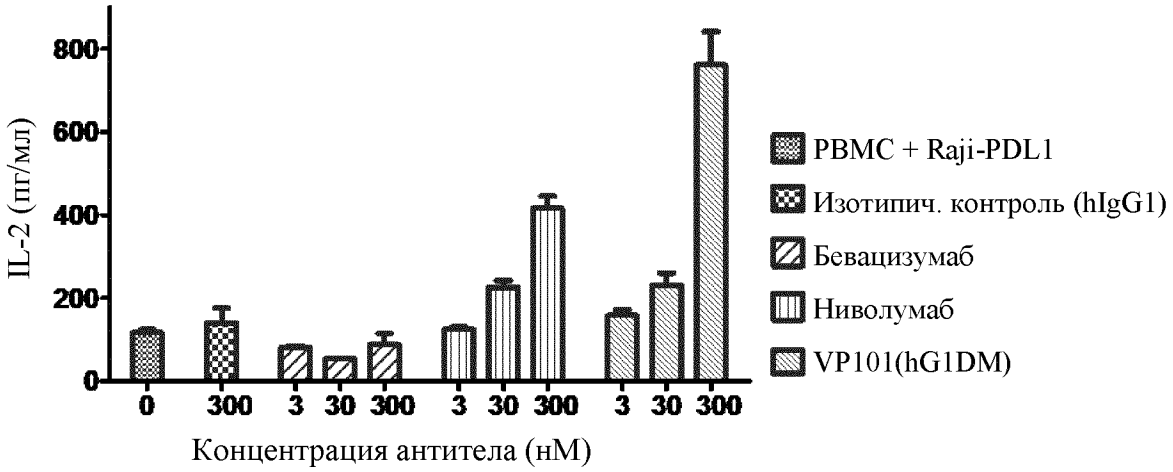
ФИГ. 32


% CDC
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
10
1
0,1
Концентрация антитела (мкг/мл)
Отрицательный контроль
Изотип. контроль (hIgG1DM)
VP101(hG1DM)
Бевацизумаб
Ниволумаб
VP101(hG1WT)
VP101(hG4WT)
14C12H1L1(G1WT)

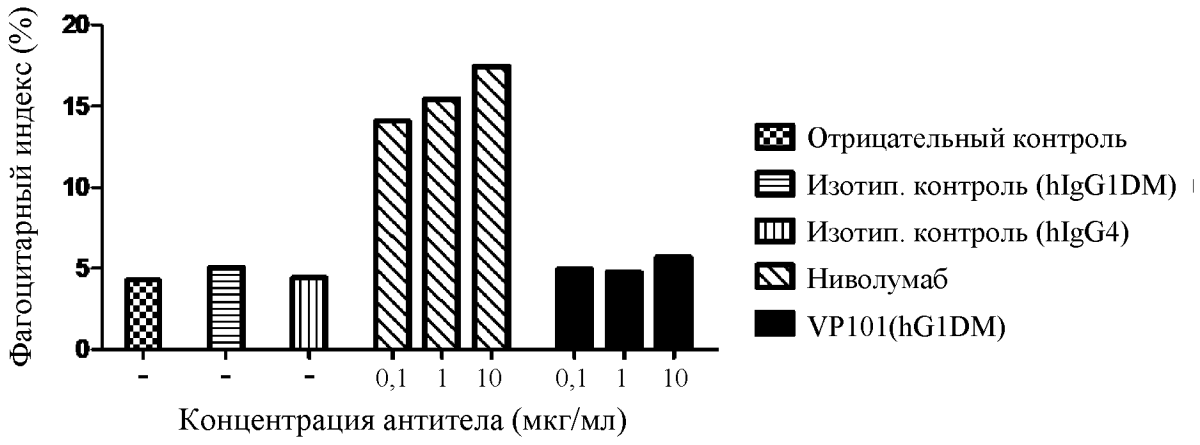
ФИГ. 33


60000
50000
40000
30000
IFN-γ (пг/мл)
0
300
3
30
300
3
30
300
3
30
300
Концентрация антитела (нМ)
PBMC + Raji-PDL1
Изотипич. контроль (hIgG1)
Бевацизумаб
Ниволумаб
VP101(hG1DM)

ФИГ. 34


800
600
400
200
0
IL-2 (пг/мл)
0
300
3
30
300
3
30
300
3
30
300
Концентрация антитела (нМ)
PBMC + Raji-PDL1
Изотипич. контроль (hIgG1)
Бевацизумаб
Ниволумаб
VP101(hG1DM)

ФИГ. 35


Фагоцитарный индекс (%)
20
15
10
5
0
-
-
-
0,1
1
10
0,1
1
10
Концентрация антитела (мкг/мл)
Отрицательный контроль
Изотип. контроль (hIgG1DM)
Изотип. контроль (hIgG4)
Ниволумаб
VP101(hG1DM)