

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091364 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.13

(22) Дата подачи заявки
2018.12.01

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИ-PD-L1/АНТИ-CD47 БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО С ПОДОБНОЙ ПРИРОДНОМУ АНТИТЕЛУ СТРУКТУРОЙ И В ФОРМЕ ГЕТЕРОДИМЕРА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 201711261880.8

(32) 2017.12.04

(33) CN

(86) PCT/CN2018/118800

(87) WO 2019/109876 2019.06.13

(71) Заявитель:

БЕЙДЖИН ХАНМИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Лю Цзяван, Ян Япин, Сун Наньмэн
(CN), Ким Маэнгсуп (KR)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М., Христофоров А.А.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к анти-PD-L1/анти-CD47 биспецифическому антителу, которое обладает характеристиками природного IgG и находится в форме весьма стабильного гетеродимера без ошибочного спаривания тяжелой цепи и легкой цепи, и способу его получения. Либо первая Fc-цепь, либо вторая Fc-цепь биспецифического антитела содержит аминокислотные замены в положениях 366 и 399, а другая содержит аминокислотные замены в положениях 351, 407 и 409.

A1

202091364

202091364

A1

**АНТИ-PD-L1/АНТИ-CD47 БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО С ПОДОБНОЙ
ПРИРОДНОМУ АНТИТЕЛУ СТРУКТУРОЙ И В ФОРМЕ ГЕТЕРОДИМЕРА И
СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к анти-PD-L1/анти-CD47 биспецифическому антителу с подобной природному антителу структурой и в форме гетеродимера и способу его получения. В частности, настоящее изобретение относится к анти-PD-L1/анти-CD47 биспецифическому антителу, которое обладает характеристиками природного IgG и находится в форме весьма стабильного гетеродимера без ошибочного спаривания тяжелой цепи и легкой цепи, и способу его получения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1) представляет собой лиганд белка программируемой смерти 1 (PD-1) иммунной контрольной точки и принадлежит к семейству B7, а также индуцируется для экспрессии на поверхностях различных иммунных клеток, включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и эндотелиальные клетки, эпидермальные клетки и т.д. После связывания PD-L1 с PD-1, PD-L1 в основном участвует в негативной регуляции активации Т-клеток, которая может регулировать силу и продолжительность иммунного ответа. Помимо того, что он является лигандом PD-1, PD-L1 также может служить лигандом для CD80, передавать сигналы негативной регуляции Т-клеткам и индуцировать иммунную толерантность Т-клеток (Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100. Front Immunol, 2013, 4: 481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. Trends Mol Med. 2015 Jan;21(1):24-33. Clin Cancer Res. 2012 Dec 15;18(24):6580-7.). При нормальных состояниях PD-L1 и PD-1 могут опосредовать и поддерживать аутоиммунную толерантность тканей организма, предотвращать чрезмерную активацию иммунной системы, приводящую к повреждению собственных тканей организма во время воспалительной реакции, и оказывать положительное влияние на предотвращение возникновения аутоиммунных заболеваний. При патологических состояниях они участвуют в возникновении и развитии опухолевого иммунитета и различных аутоиммунных заболеваний. В ряде исследований было раскрыто, что PD-L1 высоко экспрессируется в различных опухолевых тканях, а PD-1 высоко экспрессируется в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах, и сверхэкспрессия PD-L1 и PD-1 тесно связана с

плохим клиническим прогнозом в отношении опухолей (Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(3):307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar;7(1):1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan;21(1):24-33. Immunity. 2013 Jul 25;39(1):61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10;33(17):1974-82.). Применением анти-PD-L1 моноклональных антител для того, чтобы блокировать взаимодействие PD-L1/PD-1 и CD80/PD-L1, показало хорошее противоопухолевое действие в преклинических экспериментальных исследованиях и клинических испытаниях. В настоящее время анти-PD-L1 моноклональные антитела одобрены для лечения различных опухолей, таких как немелкоклеточный рак легкого и уротелиальный рак. Тем не менее, только для небольшого процента пациентов с опухолями этот тип терапии моноклональными антителами может быть благоприятным, и большинство пациентов не отвечают на этот тип моноклональных антител (Expert Opin Ther Targets. 2014 Dec;18(12):1407-20. Oncology (Williston Park). 2014 Nov;28 Suppl 3:15-28.).

CD47, также называемый интегрин-ассоциированным белком, представляет собой трансмембранный белок массой 50 кДа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Он широко экспрессируется на различных клетках, но его экспрессия значительно усилена на различных опухолевых клетках (Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(17): 6662-6667). Лиганд белка CD47 представляет собой сигнал-регуляторный белок α (SIRP α), который в основном экспрессируется в макрофагах. После связывания с CD47 он передает сигнал «не ешь меня» и ингибирует фагоцитоз макрофагов (Curr Opin Immunol, 2009,21(1):47-52). Применение анти-CD47 антител может блокировать сигнальный путь CD47-SIRP α и оказывает, таким образом, противоопухолевое действие. В настоящее время различные анти-CD47 моноклональные антитела были введены на стадию клинических исследований для лечения различных гематологических и солидных опухолей. Однако, поскольку CD47 также экспрессируется на поверхности эритроцитов, такие терапии на основе анти-CD47 антител могут привести к серьезным побочным реакциям, таким как анемия и тромбоцитопения, а также связаны с низкой биодоступностью.

В данной области все еще существует потребность в исследовании нового терапевтического лекарственного средства, которое блокирует сигнальные пути как PD-L1, так и CD47.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к новому бифункциональному антителу, которое может блокировать одновременно PD-L1 и CD47 и имеет весьма стабильную форму гетеродимера со структурными характеристиками природного IgG, и в котором отсутствует ошибочное спаривание тяжелой цепи и легкой цепи, а также к способу его получения.

Бифункциональное антитело обладает склонностью к селективному связыванию с опухолевыми клетками, которые одновременно экспрессируют PD-L1 и CD47, и, таким образом, проявляет эффективное и специфическое уничтожающее действие, оказывая при этом низкие токсические и побочные эффекты.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу в форме гетеродимера, которое содержит первую Fc-цепь и вторую Fc-цепь, и первую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с PD-L1, и вторую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с CD47,

в котором каждая из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина G, содержащий аминокислотную замену, и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь вместе составляют гетеродимер, который может связываться с Fc-рецептором,

в котором первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь связаны с первой антигенсвязывающей функциональной областью и второй антигенсвязывающей функциональной областью, соответственно, посредством ковалентной связи или линкера, и

в котором любая одна из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи содержит аминокислотные замены в положениях 366 и 399, а другая содержит аминокислотные замены в положениях 351, 407 и 409, причем положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat на основе EU-индекса.

Термины «первая Fc-цепь» и «вторая Fc-цепь» применяют в настоящем документе только с целью различия двух существующих Fc-цепей, и применение данных терминов не означает, что их значимость или порядок различны. В то же время связь первой Fc-цепи и второй Fc-цепи с первой антигенсвязывающей функциональной областью и второй антигенсвязывающей функциональной областью также является произвольной. То есть первая Fc-цепь может быть связана с первой антигенсвязывающей функциональной областью или со вторым антигенсвязывающим доменом, как и вторая Fc-цепь.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные замены первой Fc-цепи и второй Fc-цепи являются следующими:

- a) L351G, L351Y, L351V, L351P, L351D, L351E, L351K или L351W;
- b) T366L, T366P, T366W или T366V;
- c) D399C, D399N, D399I, D399G, D399R, D399T или D399A;
- d) Y407L, Y407A, Y407P, Y407F, Y407T или Y407H; и
- e) K409C, K409P, K409S, K409F, K409V, K409Q или K409R.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные замены содержат:

a) замены T366L и D399R в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351E, Y407L и K409V в другой;

b) замены T366L и D399C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351G, Y407L и K409C в другой;

c) замены T366L и D399C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351Y, Y407A и K409P в другой;

d) замены T366P и D399N в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351V, Y407P и K409S в другой;

e) замены T366W и D399G в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351D, Y407P и K409S в другой;

f) замены T366P и D399I в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351P, Y407F и K409F в другой;

g) замены T366V и D399T в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351K, Y407T и K409Q в другой;

h) замены T366L и D399A в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351W, Y407H и K409R в другой.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные замены содержат:

a) замены T366L и K409V в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351E, Y407L и D399R в другой;

b) замены T366L и K409C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351G, Y407L и D399C в другой;

c) замены T366L и K409P в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351Y, Y407A и D399C в другой;

d) замены T366P и K409S в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351V, Y407P и D399N в другой;

e) замены T366W и K409S в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351D, Y407P и D399G в другой;

f) замены T366P и K409F в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351P, Y407F и D399I в другой;

g) замены T366V и K409Q в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351K, Y407T и D399T в другой;

h) замены T366L и K409R в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351W, Y407H и D399A в другой.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислоты в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи заменены посредством T366L и D399R, и аминокислоты другой заменены посредством L351E, Y407L и K409V.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая антигенсвязывающая функциональная область и вторая антигенсвязывающая функциональная область выбраны из Fab-фрагмента, scFv-фрагмента, Fv-фрагмента переменного домена и VHH-фрагмента переменной области тяжелой цепи антитела с тяжелыми цепями.

Согласно некоторым вариантам осуществления обе, первая антигенсвязывающая функциональная область и вторая антигенсвязывающая функциональная область, представляют собой Fab-фрагменты.

Согласно некоторым вариантам осуществления одна из первой антигенсвязывающей функциональной области и второй антигенсвязывающей функциональной области представляет собой Fab-фрагмент, а другая представляет собой scFv-фрагмент.

Согласно некоторым вариантам осуществления Fab-фрагмент содержит различные первую переменную область тяжелой цепи и вторую переменную область тяжелой цепи, а также различные первую переменную область легкой цепи и вторую переменную область легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая Fc-цепь и первая антигенсвязывающая функциональная область, ковалентно связанная с ней, и вторая Fc-цепь и вторая антигенсвязывающая функциональная область, ковалентно связанная с ней, образуют менее 50 % гомодимеров из расчета на массу всех полипептидных цепей, когда присутствуют в растворе, в котором присутствует восстанавливающий агент и который не содержит другого полипептида в дополнение к первой Fc-цепи и первой антигенсвязывающей функциональной области, ковалентно связанной с ней, и второй Fc-цепи и второй антигенсвязывающей функциональной области, ковалентно связанной с ней.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая антигенсвязывающая функциональная область содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 6.

Согласно некоторым вариантам осуществления вторая антигенсвязывающая функциональная область содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 12.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая антигенсвязывающая функциональная область дополнительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 8.

Согласно некоторым вариантам осуществления вторая антигенсвязывающая функциональная область дополнительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 14.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность биспецифического антитела представляет собой соответствующее объединение последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14. Например, SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8 объединены друг с другом, и SEQ ID NO: 10, 4, 12 и 14 объединены друг с другом, и затем два объединения далее объединяются с образованием биспецифического антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно первому аспекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты первой антигенсвязывающей функциональной области, выбрана из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты второй антигенсвязывающей функциональной области, выбрана из последовательностей SEQ ID NO: 9 и 11.

Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты первой антигенсвязывающей функциональной области, дополнительно выбрана из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 7.

Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты второй антигенсвязывающей функциональной области, дополнительно выбрана из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 13.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность полинуклеотида представляет собой соответствующее объединение последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13. Например, SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7 объединены друг с другом, и SEQ ID NO: 9, 3, 11 и 13 объединены друг с другом.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор X0GC, полученный посредством модификации из pCDNA.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту или рекомбинантный экспрессионный вектор согласно третьему аспекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин выбрана из клетки эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е, полученных посредством модификации из клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка CHO или клеток CHO-S, CHO-dhfr-, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных посредством модификации из клетки CHO, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством модификации из дрожжей, клетки насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно первому аспекту или выделенный полинуклеотид согласно второму аспекту, или рекомбинантный экспрессионный вектор согласно третьему аспекту или клетку-хозяин согласно четвертому аспекту и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно первому аспекту, который предусматривает стадии:

- 1) экспрессии выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту или рекомбинантного экспрессионного вектора согласно третьему аспекту, соответственно, в клетке-хозяине;
- 2) восстановления белков, соответственно экспрессированных в клетке-хозяине; и
- 3) смешивания восстановленных белков и окисления смеси.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетку-хозяина выбирают из клетки эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е, полученных посредством модификации из клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка CHO или клеток CHO-S, CHO-dhfr-, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных посредством модификации из клетки CHO, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством модификации из дрожжей, клетки

насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления стадия восстановления предусматривает: 1) проведение стадии восстановления в присутствии восстанавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбоксиил)фосфина или других химических производных; 2) удаление восстанавливающего агента, например, проведение реакции восстановления в присутствии дитиотреитола при концентрации, равной 0,1 мМ или более, при 4 °С в течение по меньшей мере 3 часов. Ограничительные признаки восстанавливающего агента и условий реакции восстановления также относятся к другим случаям, включающим применение восстанавливающего агента и реакции восстановления, в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления стадия окисления представляет собой окисление на воздухе, а также предусматривает проведение реакции окисления в присутствии окисляющего агента, выбранного из группы, состоящей из L-дегидроаскорбиновой кислоты или ее химических производных. Например, реакцию окисления проводят в присутствии L-дегидроаскорбиновой кислоты при концентрации, равной 0,5 мМ или более, при 4 °С в течение по меньшей мере 5 часов.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает стадию отделения и очистки.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно первому аспекту и/или выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора согласно третьему аспекту, и/или клетки-хозяина согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу в форме гетеродимера согласно первому аспекту и/или выделенному полинуклеотиду согласно второму аспекту, и/или рекомбинантному экспрессионному вектору согласно третьему аспекту, и/или клетке-хозяину согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту для применения в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

Согласно девятому аспекту настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или лечения заболевания, предусматривающему введение

биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно первому аспекту и/или выделенного полинуклеотида согласно второму аспекту, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора согласно третьему аспекту, и/или клетки-хозяина согласно четвертому аспекту, и/или композиции согласно пятому аспекту субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание выбрано из следующих опухолей: лейкоз, лимфома, миелома, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, назофарингеальная карцинома, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркома матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечно-клеточный рак, меланома, мелкоклеточный рак легкого, рак костей.

Согласно настоящему изобретению сконструировано новое анти-PD-L1/анти-CD47 биспецифическое антитело в форме гетеродимера, имеющее структуру, подобную природному антителу. Оно обладает характеристиками природного IgG и не имеет ошибочное спаривание тяжелой цепи и легкой цепи, а также является высокостабильным анти-PD-L1/анти-CD47 биспецифическим антителом в форме гетеродимера. Биспецифическое антитело, полученное согласно настоящему изобретению, может одновременно связываться с двумя молекулами-мишенями PD-L1 и CD47, и оно может оказывать более хорошие эффекты при применении для лечения сложных заболеваний, чем одно терапевтическое средство. В то же время, по сравнению с комбинированной терапией несколькими лекарственными средствами, биспецифическое антитело как единая терапевтическая молекула не только облегчает использование пациентами и медицинскими работниками, но и упрощает сложный процесс разработки новых лекарственных средств.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана хроматограмма пиков элюирования анти-PD-L1-Fc1.

На фиг. 2 показана хроматограмма пиков элюирования анти-CD47-Fc2.

На фиг. 3 показана структура молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела.

На фиг. 4 показана структура молекулы полуантитела из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи.

На фиг. 5 показаны результаты анализа эксклюзионной ВЭЖХ молекулы полуантитела из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. График А и график В показывают результаты для молекулы анти-PD-L1 полуантитела и молекулы анти-CD47 полуантитела, соответственно.

На фиг. 6 показаны результаты анализа эксклюзионной ВЭЖХ молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела.

На фиг. 7 показаны результаты анализа вращательной плоскостной хроматографии (RPC) молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела.

На фиг. 8 показаны результаты анализа капиллярного электрофореза (CE) молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела.

На фиг. 9 на графике А показана аффинность анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела к PD-L1. На графике В показана аффинность анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела к CD47.

На фиг. 10 показано, что комбинация PD-L1 моноклонального антитела и анти-CD47 моноклонального антитела не может одновременно связываться с PD-L1 и CD47, и только анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело обладает активностью связывания с двумя антигенами одновременно.

На фиг. 11 на графиках А и В показана активность связывания анти-CD47 моноклонального антитела и активность связывания анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимера с HCC827 и RBC, соответственно.

На фиг. 12 показана регуляторная активность в отношении Т-клеток анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела.

На фиг. 13 показана фагоцитарная активность макрофагов в отношении опухолевых клеток, опосредованная анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерным антителом.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

Ковалентная связь означает, что в биспецифическом антителе в форме гетеродимера две Fc-цепи и любая Fc-цепь и антигенсвязывающая функциональная область связаны в одну молекулу ковалентной связью, причем Fc-цепь содержит первую антигенсвязывающую функциональную область и вторую антигенсвязывающую функциональную область, связанные посредством одной или нескольких ковалентных связей (таких как цепь дисульфидной связи), и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь соответственно связаны с антигенсвязывающей функциональной областью посредством ковалентной связи (такой как иминная связь или амидная связь).

Антигенсвязывающая функциональная область относится к области, которая может специфически взаимодействовать с молекулой-мишенью, такой как антиген, и ее действие является высокоселективным. Последовательность, которая распознает одну молекулу-мишень, как правило, не может распознавать последовательности других молекул. Иллюстративные антигенсвязывающие функциональные области включают переменные области антитела, структурные варианты переменных областей антитела, рецепторсвязывающие домены, лигандсвязывающие домены или ферментсвязывающие домены.

Связь между одной или несколькими цепями дисульфидной связи означает, что первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь связаны посредством одной или нескольких цепей дисульфидной связи с образованием гетеродимерного фрагмента. Согласно настоящему изобретению одна или несколько дисульфидных связей могут быть образованы, когда первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области синтезированы в одной и той же клетке, или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области синтезированы отдельно в разных клетках, а затем сформированы способом восстановления и окисления *in vitro*.

Первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь относятся к связанному фрагменту, образованному ковалентной связью. Ковалентная связь содержит дисульфидную связь, и каждая цепь содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь различны по аминокислотным последовательностям, включая по меньшей мере одну различную аминокислоту. В первой Fc-цепи и второй Fc-цепи согласно настоящему изобретению существует сильное взаимное отталкивание между одними и теми же цепями, и существует притяжение между различными цепями. Поэтому при совместной экспрессии в клетке первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области обладают склонностью к образованию гетеродимера. Когда первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области, соответственно, экспрессируются в двух клетках-хозяевах, первые Fc-цепи или первая Fc-цепь и связанная с ней антигенсвязывающая функциональная область не обладают склонностью к образованию гомодимера, и вторые Fc-цепи или вторая Fc-цепь и связанная с ней антигенсвязывающая функциональная область не обладают склонностью к образованию гомодимера. Согласно настоящему изобретению, когда первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области, соответственно, экспрессируются в двух клетках-хозяевах и в присутствии восстанавливающего агента,

доля гомодимеров составляет менее 50%, т.е. доля мономеров (одна Fc-цепь или одна Fc-цепь и связанная с ней антигенсвязывающая функциональная область) составляет более 50%.

Иммуноглобулин представляет собой симметричную структуру с четырьмя полипептидными цепями, две из которых представляют собой одинаковые тяжелые цепи, которые являются относительно длинными и имеют большую относительную молекулярную массу, содержат от 450 до 550 аминокислотных остатков и имеют относительную молекулярную массу от 55000 до 70000 Да, а две из которых представляют собой одинаковые легкие цепи (L-цепи), которые являются относительно короткими и имеют меньшую относительную молекулярную массу, содержат около 210 аминокислотных остатков и имеют относительную молекулярную массу около 24000 Да. Последовательность из приблизительно 110 аминокислот вблизи N-конца сильно варьируется между различными тяжелыми и легкими цепями иммуноглобулина и называется вариабельной областью (V-область), тогда как остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и называются константной областью (C-область). В тяжелой цепи вариабельная область составляет около 1/4 от длины тяжелой цепи, а константная область составляет около 3/4 от длины тяжелой цепи. Для пяти известных Ig, IgG (γ), IgA (α), IgD (δ), IgM (μ) и IgE (ϵ), первые три класса Ig имеют три константные области в H-цепи, а именно CH1, CH2 и CH3. H-цепь последних двух классов (IgM и IgE) имеет область VH и четыре константные области, а именно CH1-CH4. Константная область является не только остовом молекулы иммуноглобулина, но также одним из сайтов, которые активируют иммунный ответ. Хотя примеры настоящего изобретения относятся к IgG, специалистам в данной области техники известно, что при желании классы антител согласно настоящему изобретению можно переключать известными способами. Например, антитело согласно настоящему изобретению, которое первоначально было IgM, можно переключить по классу на антитело IgG согласно настоящему изобретению. Кроме того, методики переключения классов могут использоваться для преобразования одного подкласса IgG в другой, например, из IgG1 в IgG2. Следовательно, эффекторная функция антитела согласно настоящему изобретению может быть изменена, например, на антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, путем переключения изотипа для различных терапевтических применений. В одном примере антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1, такое как IgG1,к.

Часть константной области согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере область, в которой взаимодействуют первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь. Для

IgG эта область является частью аминокислот, расположенных в области CH3, включая по меньшей мере GLN347, TYR349, THR350, LEU351, SER354, ARG355, ASP356, GLU357, LYS360, SER364, THR366, LEU368, LYS370, ASN390, LYS392, THR394, PRO395, VAL397, ASP399, SER400, PHE405, TYR407, LYS409, LYS439.

Первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь, связанные с антигенсвязывающей функциональной областью посредством ковалентной связи или линкера, соответственно означают первую Fc-цепь и вторую Fc-цепь, связанные с антигенсвязывающим фрагментом антитела или одноцепочечным антителом, способным распознавать антиген, или другим вариантом фрагмента антитела, способным распознавать антиген, или рецептором, способным распознавать линкер, или лигандом, способным распознавать рецептор, соответственно, посредством ковалентной связи или линкера. Ковалентная связь представляет собой вид химических связей, в которых два или несколько атомов вместе используют свои внешние электроны, и, в идеальных ситуациях, достигается состояние электронного насыщения, в результате чего образуется относительно стабильная химическая структура, называемая химической связью, или ковалентная связь представляет собой взаимодействие между атомами, образованными общей электронной парой. Атомы одного и того же элемента или атомы разных элементов все могут быть связаны посредством ковалентной связи. Ковалентная связь между первой Fc-цепью и второй Fc-цепью согласно настоящему изобретению включает амидную связь, образованную посредством дегидратации между аминогруппой аминокислоты одной молекулы и карбоксильной группой аминокислоты другой молекулы, или амидную связь или имидную связь, образованную между альдегидной группой этиленгликоля или полиэтиленгликоля или другого соединения или его полимера и аминогруппой аминокислоты одной молекулы, но без ограничения. Линкер представляет собой аминокислотную последовательность или соединение или мультимер соединения, способные связывать две полипептидные цепи посредством ковалентной связи, где аминокислотная последовательность включает без ограничения небольшой пептид, такой как GGGSGGGSGGGGS, и аминокислотная последовательность связывает первую Fc-цепь или вторую Fc-цепь и одноцепочечное антитело, способное распознавать антиген, или другой структурный вариант фрагмента антитела, способный распознавать антиген, посредством амидной связи.

Первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь обладают склонностью к образованию гетеродимера и не обладают склонностью к образованию гомодимера, что означает, что в первой Fc-цепи и второй Fc-цепи существуют сильные отталкивающие силы между одними и теми же полипептидными цепями, и существуют силы притяжения между различными полипептидными цепями, и поэтому первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и

вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области обладают склонностью к образованию гетеродимера при совместной экспрессии в клетке. Когда первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь и связанные с ними антигенсвязывающие функциональные области, соответственно, экспрессируются в двух клетках-хозяевах, первые Fc-цепи или первая Fc-цепь и связанная с ней антигенсвязывающая функциональная область не обладают склонностью к образованию гомодимера, и вторые Fc-цепи или вторая Fc-цепь и связанная с ней антигенсвязывающая функциональная область также не обладают склонностью к образованию гомодимера.

Система нумерации Kabat на основе EU-индекса означает, что в данной системе Kabat присваивают номер каждой аминокислоте в последовательности антитела, и этот метод присвоения номера каждому остатку стал стандартным в данной области техники. Метод Kabat является расширяемым на другие антитела, не входящие в его охват, путем выравнивания антитела-мишени с одной из консенсусных последовательностей, идентифицируемых в системе Kabata на основе консервативных аминокислот.

Домен Fc относится к кристаллизующемуся фрагменту (Fc), соответствует CH2 и CH3 структурным доменам Ig и представляет собой сайт, в котором происходит взаимодействие между Ig и эффекторной молекулой или клеткой.

IgG представляет собой аббревиатуру для иммуноглобулина G (IgG) и является основным компонентом антитела в сыворотке крови. IgG человека имеет четыре подкласса IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 на основе антигенных различий в г-цепях в молекуле IgG.

Молекула полуантитела относится к структуре, образованной одной тяжелой цепью и одной легкой цепью антитела, где тяжелая цепь и легкая цепь могут быть связаны посредством ковалентной связи, или имеет структуру одновалентного антитела, распознающего антиген, которая может быть образована без ковалентной связи.

Fab-фрагмент представляет собой распознающую молекулу последовательность и фрагмент связывания антигена (Fab) и соответствует двум плечам молекулы антитела, каждое из которых состоит из полной легкой цепи и структурных доменов VH и CH1 тяжелой цепи. scFv представляет собой распознающую молекулу последовательность и является структурным изомером фрагмента антитела, полученным посредством генной инженерии вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи антитела. Внеклеточный домен мембранного рецептора представляет собой распознающую молекулу последовательность, и мембранный рецептор обычно включает внеклеточную область, которая расположена вне клетки и распознает соответствующий антиген или лиганд, трансмембранную область, которая закрепляет рецептор на поверхности клетки, и внутриклеточную область, которая обладает внутриклеточной киназной активностью, или

сигнальный путь, и связывается с ними. Лиганд рецептора клеточной мембраны относится к белку, небольшому пептиду или соединению, которые могут быть распознаны и связаны внеклеточной областью мембранного рецептора. Цитокины представляют собой низкомолекулярные растворимые белки, которые продуцируются различными типами клеток, индуцируемых иммуногенами, митогенами или другими стимуляторами, и выполняют различные функции, такие как регуляция врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета, кроветворения, роста клеток, мультипотентной клетки APSC и восстановления повреждения тканей и т.д. Цитокины могут быть классифицированы на интерлейкины, интерфероны, суперсемейства факторов некроза опухолей, колониестимулирующие факторы, хемотаксические факторы, факторы роста и т.д. Метка экспрессии белка означает аминокислотную последовательность, добавленную на N-конце или C-конце белка-мишени, и может представлять собой небольшие пептиды или длинные аминокислоты. Добавление метки может быть полезным для правильного сворачивания белков, выделения и очистки белка и разрушения внутриклеточного белка. Часто используемые метки могут включать без ограничения HA, SUMO, His, GST, GFP и Flag.

В отношении антител, применимых для биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно настоящему изобретению, ограничение отсутствует. Предпочтительно согласно настоящему изобретению могут быть применены антитела, уже используемые в данной области техники для профилактики и/или лечения заболеваний.

Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно настоящему изобретению может иметь одну или несколько замен, делеций, добавлений и/или вставок. Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в структуре белка без значительной потери способности связываться с другими полипептидами (например, антигенами) или клетками. Поскольку способность связываться и свойства белка определяют биологическую функциональную активность белка, замена некоторых аминокислот в последовательности белка может вызвать незначительную потерю его биологической пользы или активности.

Во многих случаях варианты полипептидов включают одну или несколько консервативных замен. «Консервативная замена» означает, что содержащиеся в полипептиде аминокислоты заменены другими аминокислотами, имеющими подобные свойства, такими, что специалисты в области химии пептидов могут ожидать, что вторичная структура и гидрофильная природа полипептида будут практически неизменными.

Аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковой цепи аминокислот, таких как гидрофобность, гидрофильность, заряд,

размер и т.д. Иллюстративные замены, для которых учитываются различные характеристики, описанные выше, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают аргинин и лизин, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту, серин и треонин, глутамин и аспарагин и валин, лейцин и изолейцин.

В контексте настоящего изобретения термин «идентичность» имеет значение, общеизвестное в данной области техники, и специалистам в данной области также известны правила и критерии определения идентичности между различными последовательностями, и идентичность относится к проценту гомологии между остатками варианта полинуклеотидной или полипептидной последовательности и остатками невариантной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов (при необходимости, для достижения максимального процента (%) гомологии). Согласно настоящему изобретению, когда определение идентичности проведено, также необходимо, чтобы полученная вариантная последовательность имела биологическую активность, которой обладает родительская последовательность. Способы и средства скрининга вариантных последовательностей с использованием вышеуказанных активностей хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие вариантные последовательности могут быть легко получены специалистами в данной области техники на основании приведенного в настоящем документе раскрытия. Согласно конкретному варианту осуществления варианты полинуклеотидов и полипептидов имеют по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности полинуклеотида или полипептида с полинуклеотидом или полипептидом, описанными в настоящем документе. Из-за вырожденности генетических кодов будут существовать варианты этих последовательностей, кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотидной композиции, способной гибридизоваться с полинуклеотидной последовательностью согласно настоящему изобретению или ее фрагментом, или последовательностью, комплементарной ей, в условиях от умеренно строгих до весьма строгих. Методы гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. В целях пояснения, подходящие умеренно строгие условия для исследования гибридизации полинуклеотида согласно настоящему изобретению с другим полинуклеотидом могут включать, соответственно, предварительную промывку раствором $5\times\text{SSC}$, 0,5% SDS, 1,0

мМ EDTA (pH 8,0), проведение гибридизации в $5\times$ SSC при от 50°C до 60°C в течение всей ночи и промывку два раза с применением $2\times$, $0,5\times$ и $0,2\times$ SSC, содержащего 0,1% SDS, в течение 20 минут при 65°C . Специалистам в данной области понятно, что строгостью гибридизации можно легко управлять, например, посредством варьирования содержания соли в растворе для гибридизации и/или температуры гибридизации. Например, согласно другому варианту осуществления подходящие весьма строгие условия гибридизации включают условия, описанные выше, за исключением того, что в этом случае температуру гибридизации повышают, например, до от 60°C до 65°C или от 65°C до 70°C .

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

Вектор согласно настоящему изобретению включает вектор, который может реплицироваться в клетках или организмах любого типа и включает, например, плазмиды, бактериофаги, космиды и минихромосомы. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор, включающий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, представляет собой вектор, подходящий для размножения или репликации полинуклеотида, или вектор, подходящий для экспрессии полипептида согласно настоящему изобретению. Такие векторы известны в данной области и являются коммерчески доступными.

Термин «вектор» может включать шаттл-вектор и экспрессионный вектор. В общем плазмидная конструкция также может включать точку начала репликации (например, точку начала репликации ColE1) и маркер отбора (например, устойчивость к ампициллину или тетрациклину), которые предназначены, соответственно, для репликации и селекции плазмиды в бактериях. Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, включающему контрольную последовательность или регуляторный элемент, который необходим для экспрессии антитела согласно настоящему изобретению, включая фрагменты антитела, в бактериальных или эукариотических клетках.

Вектор согласно настоящему изобретению может представлять собой любой вектор, используемый для экспрессии чужеродного гена, и может включать без ограничения плазмидный вектор, причем плазмидный вектор включает по меньшей мере точку начала репликации, промотор, представляющий интерес ген, сайт множественного клонирования, ген маркера отбора. Предпочтительно вектор согласно настоящему изобретению включает без ограничения плазмидный вектор, полученный путем модификации pcDNA, такой как вектор X0GC.

Субъект согласно настоящему изобретению может включать птиц, рептилий, млекопитающих и т.д. Млекопитающее включает грызуна, примата. Предпочтительно, примат включает человека.

Объем заболеваний согласно настоящему изобретению включает без ограничения опухоли. Опухоли предпочтительно могут включать лейкоз, лимфому, миелому, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, назофарингеальную карциному, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркому матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечно-клеточный рак, меланому, мелкоклеточный рак легкого, рак костей.

Фармацевтически приемлемый носитель означает фармацевтический носитель, который обычно применяют в фармацевтической области, например, разбавители, вспомогательные вещества, воду и т.д., наполнители, такие как крахмал, сахароза, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза и т.д., связующие, такие как производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинипирролидон, смачивающие вещества, такие как глицерин, разрыхлители, такие как карбоксиметилкрахмал натрия, гидроксипропилцеллюлоза, кроскармеллоза, агар, карбонат кальция, гидрокарбонат натрия и т.д., усилители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения, поверхностно-активные вещества, такие как цетанол, лаурилсульфат натрия и т.д., адсорбционные носители, такие как каолинит, бентонит и т.д., смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция и магния, микронизированный силикагель, полиэтиленгликоль и т.д. Кроме того, в композицию могут быть добавлены другие добавки, такие как ароматизаторы, подсластители и т.д.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к следующим техническим решениям.

Техническое решение 1. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера, которое содержит первую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с PD-L1, и вторую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с CD47, причем биспецифическое антитело содержит первую Fc-цепь и вторую Fc-цепь, связанные посредством одной или нескольких цепей дисульфидной связи, и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь связаны с антигенсвязывающей функциональной областью PD-L1 и антигенсвязывающей функциональной областью CD47, соответственно, посредством ковалентной связи или линкера, или первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь связаны с антигенсвязывающей функциональной областью CD47 и антигенсвязывающей функциональной областью PD-

L1, соответственно, посредством ковалентной связи или линкера, и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь содержат 5 аминокислотных замен в следующих положениях:

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

2) аминокислотные замены в положениях 366 и 409 в первой Fc-цепи и аминокислотные замены в положениях 351, 399 и 407 во второй Fc-цепи,

причем первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь, содержащие вышеуказанные аминокислотные замены, скорее обладают склонностью к образованию гетеродимера друг с другом, чем к образованию гомодимера каждой,

где положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat на основе EU-индекса.

Техническое решение 2. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно техническому решению 1, в котором аминокислотные замены первой Fc-цепи и второй Fc-цепи являются следующими:

a) замена на глицин, тирозин, валин, пролин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин или триптофан в положении 351,

b) замена на лейцин, пролин, триптофан или валин в положении 366,

c) замена на цистеин, аспарагин, изолейцин, глицин, аргинин, треонин или аланин в положении 399,

d) замена на лейцин, аланин, пролин, фенилаланин, треонин или гистидин в положении 407, и

e) замена на цистеин, пролин, серин, фенилаланин, валин, глутамин или аргинин в положении 409.

Техническое решение 3. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно техническому решению 1 или 2, в котором аминокислотные замены содержат:

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

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

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

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

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

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

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

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

Техническое решение 4. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-3, в котором аминокислотные замены содержат:

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

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

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

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

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

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

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

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

Техническое решение 5. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно техническому решению 1, в котором аминокислоты первой Fc-цепи заменены посредством T366L и D399R, а аминокислоты второй Fc-цепи заменены посредством L351E, Y407L и K409V.

Техническое решение 6. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-5, в котором Fc-цепь происходит из IgG.

Техническое решение 7. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-6, в котором антигенсвязывающие функциональные области PD-L1 и CD47 представляют собой Fab-фрагменты или scFv-фрагменты.

Техническое решение 8. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-7, в котором обе антигенсвязывающие функциональные области PD-L1 и CD47 представляют собой Fab-фрагменты.

Техническое решение 9. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно техническим решениям 1-7, в котором одна из антигенсвязывающих функциональных областей PD-L1 и CD47 представляет собой Fab-фрагмент, а другая представляет собой scFv-фрагмент.

Техническое решение 10. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 7-9, в котором Fab-фрагмент содержит различные первую переменную область тяжелой цепи и вторую переменную область тяжелой цепи, а также различные первую переменную область легкой цепи и вторую переменную область легкой цепи.

Техническое решение 11. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-10, в котором первая Fc-цепь и антигенсвязывающая функциональная область PD-L1, связанная с ней, и вторая Fc-цепь и антигенсвязывающая функциональная область CD47, связанная с ней, или первая Fc-цепь и антигенсвязывающая функциональная область CD47, связанная с ней, и вторая Fc-цепь и антигенсвязывающая функциональная область PD-L1, связанная с ней, образуют менее 50 мас.% гомодимеров, когда присутствуют сами по себе или вместе с восстанавливающим агентом.

Техническое решение 12. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-11, в котором аминокислотная последовательность биспецифического антитела выбрана из последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14.

Техническое решение 13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12.

Техническое решение 14. Выделенный полинуклеотид согласно техническому решению 13, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13.

Техническое решение 15. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид согласно техническому решению 13 или 14.

Техническое решение 16. Рекомбинантный экспрессионный вектор согласно техническому решению 15, причем экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор X0GC, полученный посредством модификации из pCDNA.

Техническое решение 17. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид согласно техническому решению 13 или 14 или рекомбинантный экспрессионный вектор согласно техническому решению 15 или 16.

Техническое решение 18. Клетка-хозяин согласно техническому решению 17, которая выбрана из клетки эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е, полученных посредством модификации из клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка CHO или клеток CHO-S, CHO-dhfr-, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных посредством модификации из клетки CHO, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством модификации из дрожжей, клетки насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

Техническое решение 19. Композиция, содержащая биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12 или выделенный полинуклеотид согласно техническому решению 13 или 14, или рекомбинантный экспрессионный вектор согласно техническому решению 15 или 16, или клетку-хозяин согласно техническому решению 17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

Техническое решение 20. Способ получения биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12, который предусматривает стадии:

- 1) экспрессии выделенного полинуклеотида согласно техническому решению 13 или 14 или рекомбинантного экспрессионного вектора согласно техническому решению 15 или 16, соответственно, в клетке-хозяине;
- 2) восстановления белков, соответственно экспрессированных в клетке-хозяине, и
- 3) смешивания восстановленных белков и окисления смеси.

Техническое решение 21. Способ согласно техническому решению 20, в котором клетку-хозяина выбирают из клетки эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е, полученных посредством модификации из клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка CHO или клеток CHO-S, CHO-dhfr-, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных посредством модификации из клетки CHO, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством

модификации из дрожжей, клетки насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

Техническое решение 22. Способ согласно техническому решению 20 или 21, в котором стадия восстановления предусматривает 1) добавление восстанавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбоксиэтил)фосфина или других химических производных, 2) проведение реакции восстановления в присутствии дитиотреитола при концентрации, равной 0,1 мМ или более, при 4 °С в течение по меньшей мере 3 часов, 3) удаление восстанавливающего агента, как например, посредством обессоливания.

Техническое решение 23. Способ согласно любому из технических решений 20-22, в котором стадия окисления предусматривает 1) окисление на воздухе, а также предусматривает добавление окисляющего агента, выбранного из группы, состоящей из L-дегидроаскорбиновой кислоты или других химических производных, 2) проведение реакции окисления в присутствии L-дегидроаскорбиновой кислоты при концентрации, равной 0,5 мМ или более, при 4 °С в течение по меньшей мере 5 часов.

Техническое решение 24. Способ согласно любому из технических решений 20-23, дополнительно предусматривающий стадию отделения и очистки.

Техническое решение 25. Применение биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12 и/или выделенного полинуклеотида согласно техническому решению 13 или 14, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора согласно техническому решению 15 или 16, и/или клетки-хозяина согласно техническому решению 17 или 18, и/или композиции согласно техническому решению 19 для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

Техническое решение 26. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12 и/или выделенный полинуклеотид согласно техническому решению 13 или 14, и/или рекомбинантный экспрессионный вектор согласно техническому решению 15 или 16, и/или клетка-хозяин согласно техническому решению 17 или 18, и/или композиция согласно техническому решению 19 для применения в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

Техническое решение 27. Способ профилактики и/или лечения заболевания, предусматривающий введение биспецифического антитела в форме гетеродимера согласно любому из технических решений 1-12 и/или выделенного полинуклеотида согласно техническому решению 13 или 14, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора

согласно техническому решению 15 или 16, и/или клетки-хозяина согласно техническому решению 17 или 18, и/или композиции согласно техническому решению 19 субъекту, нуждающемуся в этом.

Техническое решение 28. Применение согласно техническому решению 25, биспецифическое антитело в форме гетеродимера, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин или композиция согласно техническому решению 26, или способ согласно техническому решению 27, причем субъектом является млекопитающее, предпочтительно субъектом является человек.

Техническое решение 29. Применение согласно техническому решению 25, биспецифическое антитело в форме гетеродимера, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин или композиция согласно техническому решению 26, или способ согласно техническому решению 27, причем заболевание выбрано из следующих опухолей: лейкоз, лимфома, миелома, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, назофарингеальная карцинома, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркома матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечно-клеточный рак, меланома, мелкоклеточный рак легкого, рак костей.

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

Следующие экспериментальные способы являются повсеместно применяемыми способами, если не указано иное, и используемые экспериментальные материалы также могут быть легко приобретены у коммерческих компаний, если не указано иное. Различные антитела, используемые в следующих примерах настоящего изобретения, все представляют собой стандартные антитела, полученные коммерческим путем.

Пример 1. Конструирование вектора молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела

Конструировали экспрессионные векторы X0GC, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против PD-L1 человека, соответственно, в которых последовательность вариабельной области антитела получали из <http://imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=526>, и константной областью тяжелой цепи был IgG1 человека (Fc1, в

который вводили мутацию N297A для исключения ADCC/CDC эффекта). Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO. 1, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 2, нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO. 3, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 4, нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO. 5, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 6, нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO. 7, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 8. Вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи, а также вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, соответственно, амплифицировали посредством ПЦР. Во всех реакциях ПЦР согласно настоящему изобретению применяли высокоточную ДНК-полимеразу Phusion (F-530L) от NEB, Inc. Праймеры для ПЦР конструировали обычным образом в соответствии с принципом комплементации оснований и потребностью сайтов ферментативного расщепления. Каждая реакционная система состояла из 8,9 мкл H₂O, 4 мкл 5×буфера высокоточной ДНК полимеразы Phusion, 4 мкл 1 мМ dNTP, 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера, 0,1 мкл высокоточной ДНК полимеразы Phusion и 1 мкл матрицы. Продукты ПЦР вариабельной области и константной области подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле, и соответствующие фрагменты выделяли с использованием набора для выделения ДНК (Promega, A9282, такой же далее). Выделенный фрагмент вариабельной области и выделенный фрагмент константной области применяли в качестве матриц, и прямой праймер вариабельной области и обратный праймер константной области применяли для проведения другого цикла ПЦР. Соответствующие фрагменты снова выделяли с получением фрагментов полной длины легкой цепи и тяжелой цепи. Вектор X0GC и фрагменты полной длины ферментативно расщепляли с применением EcoRI (NEB, кат. № R3101L) и HindIII (NEB, кат. № R3104L). Система ферментативного расщепления состояла из 2 мкл 10×буфера 3, 0,5 мкл каждой из EcoRI и HindIII, 3 мкл фрагментов полной длины, выделенных из геля, и 14,5 мкл H₂O. Систему ферментативного расщепления применяли при 37°C в течение трех часов. Ферментативно расщепленные продукты лигировали с применением лигазы T4DNA (NEB, кат. № M0202V) (такая же далее), и реакционная система состояла из 2 мкл 10x лигазного буфера, 0,5 мкл лигазы, 3 мкл фрагментов полной длины, выделенных из геля, 3 мкл вектора X0GC, выделенного из геля, и 11,5 мкл H₂O. Лигирование проводили при комнатной температуре в течение 12 часов. Продукт лигирования трансформировали в компетентную клетку *E. coli* DH5α (Tiangen, CB104, такая

же далее). Экспрессионные векторы X0GC тяжелой цепи и легкой цепи антитела получали для экспрессии тяжелой цепи (Fc1) и легкой цепи антитела, соответственно, в эукариотических клетках.

Согласно настоящему изобретению экспрессионные вектора X0GC, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против CD47 человека, соответственно, конструировали, причем последовательность вариабельной области антитела получали из WO2016109415A1. Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO. 9, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 10, нуклеотидная последовательность константной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO. 3, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 4, нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO. 11, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 12, нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO. 13, и ее аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 14. Экспрессионные вектора X0GC тяжелой цепи и легкой цепи антитела получали для экспрессии тяжелой цепи антитела (Fc2) и легкой цепи антитела, соответственно, в эукариотических клетках.

Пример 2. Экспрессия молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела

Экспрессионные векторы, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против PD-L1 человека, трансфицировали в клетки 293F (клетки FreeStyle™ 293-F, кат. № R79007, Invitrogen), соответственно, и экспрессионные векторы, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против CD47 человека, также трансфицировали в клетки 293F, соответственно. За день до трансфекции клетки высевали. В день трансфекции клетки собирали посредством центрифугирования и ресуспендировали в свежей экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (кат. № 12338001, Gibco) при плотности клеток 200×10^5 клеток/мл. Плазмиды добавляли в соответствии с объемом трансфекции до конечной концентрации 36,67 мкг/мл, и среду аккуратно перемешивали до гомогенности. Затем линейный PEI (линейный полиэтиленмин, молекулярная масса 25000, кат. № 43896, Alfa Aesar) добавляли до конечной концентрации 55 мкг/мл, и среду аккуратно перемешивали до гомогенности. Затем смесь помещали в инкубатор и инкубировали на качалке при 120 оборотах в минуту при 37°C в течение 1 часа. Затем к ней добавили свежую среду в количестве 19-ти кратного объема трансфекции. Инкубацию проводили непрерывно на

качалке при 120 оборотах в минуту при 37°C. Супернатант культуры клеток, трансфицированных в течение от 5 до 6 дней, собирали посредством центрифугирования.

Уровень экспрессии определяли посредством анализа ELISA. Перед очисткой на хроматографической колонке осадок удаляли посредством фильтрации через фильтр с размером 0,2 мкм. Эту стадию проводили при 4°C.

Пример 3. Очистка продукта экспрессии молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела

Очистку проводили при 4°C с применением системы очистки белка АКТА explorer типа 100 (GE Healthcare) и колонки для аффинной хроматографии rProtein A Sepharose Fast Flow (16 мм по внутреннему диаметру, 22 мл, GE Healthcare). Сначала подвижную фазу А (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 150 мМ хлорид натрия, рН 7,4) применяли для уравнивания хроматографической колонки. После стабилизации базовой линии супернатант клеток, обработанных как указано выше, загружали при скорости потока 5 мл/мин. После загрузки образца, уравнивание проводили с применением подвижной фазы А. Образцы представляли собой анти-PD-L1 продукт экспрессии и анти-CD47 продукт экспрессии, соответственно. После этого подвижную фазу В1 (подвижная фаза А, содержащая 0,5 М аргинина) применяли для элюирования пяти объемов колонки. Затем подвижную фазу В2 (100 мМ лимонной кислоты, рН 3,0) применяли для элюирования пяти объемов колонки для того, чтобы собрать пик элюирования, т.е. пик представляющего интерес белка. Скорость потока в ходе вышеуказанных стадий промывки для всех составляла 5 мл/мин. Хроматограмма пика элюирования для анти-PD-L1-Fc1 представлена на фиг.1, и хроматограмма пика элюирования для анти-CD47-Fc2 представлена на фиг.2. Указанный пик элюирования (площадь, показанная серым цветом на чертеже) собирали, и значение рН доводили до 5,0 посредством добавления 1 М раствора ацетата натрия по каплям.

Пример 4. Получение и очистка молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела

Структура молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела представлена на фиг. 3.

Продукт, полученный с помощью вышеуказанного способа rProtein A Sepharose Fast Flow (16 мм по внутреннему диаметру, 22 мл, GE Healthcare), подвергали рекомбинации *in vitro* с получением гетеродимера. Сначала вышеуказанный очищенный и собранный раствор белка концентрировали посредством ультрафильтрации через колонку для

концентрирования ультрафильтрацией (отсечка по номинальной молекулярной массе составляет 10 кДа), и раствор заменяли на фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) (pH = 7,4). Растворы полученных анти-PD-L1 и анти-CD47 продуктов очистки, соответственно, доводили до концентрации 1 мг/мл посредством добавления PBS и добавляли 1/200 кратный конечный объем 1 М DTT (конечные концентрации DTT составляли 0,1мМ, 0,5мМ, 1мМ, 2мМ, 5мМ, 10мМ, 20мМ, соответственно). Восстановление проводили при 4°C (от 3 часов до 8 часов), и дисульфидные связи открывали посредством процесса восстановления. Дисульфидные связи в шарнирных областях гомодимерных молекул антитела, содержащихся в анти-PD-L1 и анти-CD47 продукта, также открывали, получая, таким образом, молекулу полуантитела, содержащего одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, структура которого показана на фиг. 4. Восстановленный образец анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ (TOSOH, TSK-гель superSW3000) с содержанием 1 мМ DTT в качестве восстанавливающего агента в буфере подвижной фазы. Результаты показаны на фиг. 5. Соотношение анти-PD-L1 и анти-CD47 гомодимеров во всех случаях составляло менее 10%, тогда как соотношение молекул полуантитела во всех случаях составляло более 90%.

После этого восстановленные молекулы анти-PD-L1 и анти-CD47 полуантител смешивали при равном молярном соотношении, и реакцию рекомбинации проводили при 4°C в течение 0,5-24 часов. В ходе рекомбинации гетеродимерное биспецифическое антитело, содержащее молекулы как анти-PD-L1, так и анти-CD47 полуантитела, получали посредством нековалентного взаимодействия между CH2 и CH3 молекул анти-PD-L1 и анти-CD47 полуантитела. Затем раствор белка концентрировали посредством ультрафильтрации через колонку для концентрирования ультрафильтрацией (отсечка по номинальной молекулярной массе составляет 10 кДа), и раствор заменяли на фосфатный раствор (PBS, pH = 7,4), чтобы прекратить восстановление. Раствор подвергали окислению на воздухе или с применением окисляющего агента с обеспечением образования дисульфидных связей гетеродимерного биспецифического антитела. Условия окисления были следующими: образец помещали на воздух на 1 день, 3 дня, 4 дня, и 100 мМ L-дегидроаскорбиновой кислоты в качестве окисляющего агента добавляли (конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл, и конечные концентрации окисляющего агента составляли 0,5мМ, 1мМ, 5мМ, 10мМ), и окисление проводили при 4°C в течение 24 часов.

Молекулу анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимера, полученную восстановлением/окислением вышеописанных анти-PD-L1 и анти-CD47 продуктов экспрессии, концентрировали посредством ультрафильтрации через колонку для концентрирования ультрафильтрацией (отсечка по номинальной молекулярной массе

составляет 10 кДа), раствор заменяли на раствор натрий-фосфатного буфера, рН 5,8. Очистку проводили при 4°C с применением системы для очистки белка АКТА explorer типа 100 (GE Healthcare) и колонки для ионной хроматографии Source 15S (16 мм по внутреннему диаметру, 17 мл, GE Healthcare). Сначала подвижную фазу А (10 мМ фосфат натрия, рН 7,0) применяли для уравнивания хроматографической колонки. После стабилизации базовой линии раствор белка, обработанный как указано выше, загружали при скорости потока 3 мл/мин. После загрузки образца уравнивание проводили с применением подвижной фазы А. После этого 20 объемов колонки (0% В-100% В, 170 мин, скорость потока 2 мл/мин) промывали с применением градиента А (10 мМ фосфат натрия, рН 5,8) - В (10 мМ фосфат натрия, рН 5,8). Собирали основной пик элюирования, и собранный раствор белка концентрировали посредством ультрафильтрации через колонку для концентрирования ультрафильтрацией (отсечка по номинальной молекулярной массе составляет 10 кДа). Раствор заменяли на фосфатный раствор (PBS, рН = 7,4), фильтровали и стерилизовали, а затем хранили при 4°C. Чистоту очищенного продукта анализировали посредством метода эксклюзионной хроматографии, и результаты представлены на фиг. 6. Чистота составляла 99,3%. По результатам анализа RPC-ВЭЖХ (Thermo Fisher, MAbPac RP) чистота составляла 100%, как показано на фиг. 7. По результатам анализа СЕ чистота составляла 97,1%, как показано на фиг. 8.

Пример 5. Активность связывания с мишенью молекулы анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела

Активность связывания анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела с одним антигеном определяли посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Детали методики ELISA были следующими: рекомбинантный PD-L1 человека (Sino Biological Inc., кат. № 10377-H08H) или CD47 человека (Beijing ACROBiosystems, кат. № CD7-H5227) наносили на 96-луночный планшет ELISA высокой адсорбции (Costar, кат. № 42592) с использованием карбонатного буферного раствора (0,05M) с рН 9,6 при концентрации нанесения 1 мкг/мл и количестве нанесения 100 мкл на лунку. Нанесение проводили при 4 °С в течение ночи. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Планшет блокировали с применением 300 мкл/лунка PBST, содержащего 1% BSA, инкубировали в течение 1 часа при 25 °С и промывали с применением PBST пять раз. Образец гетеродимерного антитела и контроль, серийно разбавленные PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25 °С в течение 1 часа. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Затем антитело против IgG человека, меченное пероксидазой хрена (Chemicon, кат. № AP309P), разбавленное 1:10000

с применением PBST, содержащего 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Колориметрический субстрат ТМВ добавляли в количестве 100 мкл/лунка, и реакция протекала в течение 10 минут при комнатной температуре. Развитие цвета прекращали посредством добавления 100 мкл/лунка 1 М H₂SO₄. Регистрировали поглощение при 450 нм на микропланшетном ридере.

В результате, как показано на фиг. 9, график А, анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело обладает высокой аффинностью к PD-L1, которая сопоставима с антигенсвязывающей активностью анти-PD-L1 двухвалентного моноклонального антитела, и, как показано на фиг. 9, график В, анти- PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело обладает высокой аффинностью к CD47, которая сопоставима с антигенсвязывающей активностью анти- CD47 двухвалентного моноклонального антитела.

Пример 6. Активность одновременного связывания анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела с двойными мишенями

Способность анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела одновременно связываться с двумя различными антигенами определяли посредством твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA).

Детали методики ELISA были следующими: рекомбинантный CD47 человека (Beijing ACROBiosystems, кат. № CD7-H5227) наносили на 96-луночную планшет ELISA высокой адсорбции с использованием карбонатного буферного раствора с pH 9,6 при концентрации нанесения 1 мкг/мл и количестве нанесения 100 мкл на лунку. Нанесение проводили при 4 °C в течение ночи. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Планшет блокировали с применением 300 мкл/лунка PBST, содержащего 1% BSA, инкубировали в течение 1 часа при 25 °C и промывали с применением PBST пять раз. Образец гетеродимерного антитела и контроль, серийно разбавленные PBST, содержащим 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25 °C в течение 1 часа. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Меченный биотином PD-L1-Fc (Beijing Hanmi pharmaceutical) при 0,5 мкг/мл, разбавленный с применением PBST, содержащего 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Конъюгат стрептавидина и пероксидазы хрена (BD Pharmingen, кат. № 554066), разбавленный 1:1000 с применением PBST, содержащего 1% BSA, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали с применением PBST пять раз. Колориметрический субстрат ТМВ добавляли в количестве 100 мкл/лунка, и реакция протекала в течение 10 минут при комнатной

температуре. Развитие цвета прекращали посредством добавления 100 мкл/лунка 1M H₂SO₄. Регистрировали поглощение при 450 нм на микропланшетном ридере.

В результате, как показано на фиг. 10, график А, комбинация анти-PD-L1 моноклонального антитела и анти-CD47 моноклонального антитела не может одновременно связываться с PD-L1 и CD47, и только анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело обладает активностью одновременно связываться с двумя антигенами.

Пример 7. Связывание анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела с опухолевыми клетками/эритроцитами

Опухолевые клетки HCC827 экспрессируют PD-L1 и CD47, а эритроциты (RBC) экспрессируют только CD47. Клетки HCC827 и клетки RBC смешивали, и проточную цитометрию (FCM) применяли для обнаружения является ли гетеродимер селективным в отношении связывания с двумя клетками в смешанных клетках.

Детали методики этого способа были следующими: клетки HCC827 (приобретенные у ATCC) и клетки RBC (собранные у здоровых людей) собирали и один раз промывали холодным DPBS (GIBCO, кат. № 14190-235), содержащим 2% FBS. (Hyclone, кат. № SH30084,03). Клетки HCC827 смешивали при 1×10^6 клеток/пробирка, а клетки RBC смешивали при 10×10^6 клеток/пробирка и ресуспендировали в 200 мкл холодного DPBS, содержащего 2% FBS. Образец гетеродимерного антитела и контроль, серийно разведенные, добавляли. Пробирку для проточной цитометрией инкубировали на льду в течение 30 минут и дважды промывали DPBS, содержащим 2% FBS. Клетки снова ресуспендировали в 200 мкл холодного DPBS, содержащего 2% FBS и разбавленное 1:1000 FITC-меченное антитело против IgG человека (Beijing Zhongshan Goldenbridge, кат. № ZF0306), и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Клетки промывали DPBS, содержащим 2% FBS, и затем ресуспендировали в 500 мкл холодного DPBS. Суспензию клеток анализировали на проточном цитометре (BD, FACS, Calibur), и интенсивность флуоресценции регистрировали для каждой из двух клеток в смешанных клетках.

В результате, как показано на фиг. 11, связывание анти-CD47 моноклонального антитела со смешанными клетками HCC827 и клетками RBC является в основном одинаковым (график А), тогда как анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимер обладает склонностью к связыванию с клетками HCC827, экспрессирующими PD-L1 и CD47, в то время как он слабо связывается с клетками RBC, экспрессирующими только CD47, демонстрируя селективность связывания (график В).

Пример 8. Регуляторная активность анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела в отношении Т-клеток

Реакцию смешанных лимфоцитов (MLR) применяли для определения регуляторной активности анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерного антитела на Т –клеточный иммунный ответ.

Получение дендритных клеток (DC) человека: клетки PBMC человека (Lonza, кат. № CC-2702) собирали путем оттаивания. Клетки PBMC человека ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 (GIBCO, кат. № 22400-089) при плотности клеток 5×10^6 /мл, высевали в колбу для культивирования клеток и инкубировали в инкубаторе с CO₂ при 37 °C в течение 90 минут. Супернатант культуры и суспендированные клетки отбрасывали. Прикрепленные клетки культивировали в полной среде (RPMI 1640 с 10% FBS) и добавляли 100 нг/мл GM-CSF (Sino Biological Inc., кат. № 10015-HNAH) и 100 нг/мл IL-4 (Sino Biological Inc., кат. № 11846-HNAE). Клетки инкубировали в течение 3 дней. После замены среды на свежую клетки инкубировали еще 3 дня. Затем среду заменяли на полную среду (RPMI 1640 с 10% FBS), содержащую 100 нг/мл GM-CSF, 100 нг/мл IL-4 и 20 нг/мл TNF- α , и клетки инкубировали в течение 1 дня с получением DC клеток.

Получение Т-клеток человека: клетки PBMC человека собирали путем оттаивания. Такие клетки PBMC и клетки PBMC для индукции клеток DC происходили из различных субъектов. Т-клетки выделяли согласно инструкции для набора Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, кат. № 5150414820). Кратко, клетки PBMC промывали один раз с применением DPBS, затем ресуспендировали при плотности 10^7 клеток на 40 мкл буфера разделения (DPBS, содержащий 2мМ EDTA, 0,5% BSA, pH = 7,2) (следующие количество все приведены из расчета на 10^7 клеток), добавляли 10 мкл Pan T cell Biotin Antibody Cocktail и инкубировали при 4 °C в течение 5 минут. После добавления 30 мкл буфера разделения и 20 мкл Pan Cell MicroBead Cocktail, клетки инкубировали при 4 °C в течение 10 минут. После прохождения через разделительную колонку MACS получали Т-клетки.

Собранные DC клетки человека и Т-клетки человека ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640 с 10% FBS) и высевали на 96-луночный планшет. Клетки DC и Т-клетки высевали при плотности 1×10^4 /лунка и 1×10^5 /лунка, соответственно, и культивировали в смеси. Добавляли образец гетеродимерного антитела и контроль, каждый серийно разбавленный полной средой. Планшет инкубировали в инкубаторе с CO₂ при 37 °C в течение 5 дней. После инкубации супернатант в лунке удаляли, и цитокин IFN- γ определяли в соответствии с инструкцией для набора (RayBiotech, кат. № ELH-IFNg).

Как показано на фиг.12, Т-клетки человека активируются для секреции IFN- γ после стимуляции аллогенными DC клетками. Добавление анти-PD-L1 антитела будет усиливать активацию Т-клеток и стимулировать секрецию цитокинов. Анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело также проявляет сильную регуляторную активность в отношении Т-клеток, значительно способствуя секреции цитокина IFN- γ .

Пример 9. Фагоцитарная активность макрофагов против опухолевых клеток, опосредованная анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерным антителом

Приготовление зрелых макрофагов человека: клетки PBMC человека (Lonza, кат. № CC-2702) собирали путем оттаивания. Клетки PBMC человека ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 при плотности клеток 5×10^6 /мл, высевали в колбу для культивирования клеток и инкубировали в инкубаторе с CO₂ при 37 °C в течение 90 минут. Супернатант культуры и суспендированные клетки отбрасывали. Прикрепленные клетки культивировали в полной среде (RPMI 1640 с 10% FBS) и добавляли 25 нг/мл M-CSF (Sino Biological Inc., кат. № 10015-HNAH). Клетки инкубировали в течение 7 дней. Затем макрофаги собирали и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640 с 10% FBS), и 25 нг/мл M-CSF и 50 нг/мл IFN- γ (Sino Biological Inc., кат. № 11725-HNAS) добавляли. Суспензию клеток высевали на 48-луночный планшет для культивирования клеток при 50000 клеток на лунку и инкубировали в течение 1 дня для того, чтобы макрофаги созрели и были готовы для применения.

Опухолевые клетки линии Раджи окрашивали в соответствии с инструкцией по применению набора CFSE (Life Technology, кат. № C34554). Кратко, CFSE разбавляли с применением DPBS до рабочей концентрации 5 мкМ. После предварительного нагрева при 37 °C клетки линии Раджи собирали центрифугированием при 1000 оборотах в минуту в течение 5 минут. После ресуспендирования с предварительно нагретым рабочим раствором CFSE клетки линии Раджи инкубировали при 37 °C в течение 15 минут. Клетки промывали один раз полной средой, ресуспендировали в полной среде, инкубировали в течение 30 минут, дважды промывали полной средой и затем ресуспендировали в полной среде для использования.

48-луночный планшет промывали 3 раза полной средой. Клетки линии Раджи, окрашенные CFSE, предварительно инкубировали с образцом гетеродимера, подлежащего тестированию, и контролем в течение 15 минут, затем добавляли на 48-луночный культуральный планшет и инкубировали в инкубаторе с CO₂ при 37 °C в течение 2 часов. После инкубации 48-луночный планшет трижды промывали полной средой, добавляли 10 мкг/мл агглютинаина зародышей пшеницы, alexa, fluor 555 (Life technologies, № W32464),

разведенные в полной среде, и инкубировали в течение 15 минут в темноте. 48-луночный планшет промывали еще три раза полной средой и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 минут. 48-луночный планшет промывали еще три раза полной средой и добавляли полную среду. Клетки подсчитывали фотографированием с помощью флуоресцентного микроскопа. Метод расчета фагоцитарного индекса (%) состоял в следующем: количество фагоцитированных меченых зеленым клеток линии Раджи/количество существующих меченых красных макрофагов \times 100.

Как показано на фиг. 13, анти-PD-L1/анти-CD47 гетеродимерное антитело может опосредовать фагоцитоз опухолевых клеток линии Раджи макрофагами сопоставимо с активностью анти-CD47 моноклонального антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера, которое содержит первую Fc-цепь и вторую Fc-цепь и первую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с PD-L1, и вторую антигенсвязывающую функциональную область, которая может специфически связываться с CD47,

в котором каждая из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина G, содержащий аминокислотную замену, и первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь вместе составляют гетеродимер, который может связываться с Fc-рецептором,

в котором первая Fc-цепь и вторая Fc-цепь связаны с первой антигенсвязывающей функциональной областью и второй антигенсвязывающей функциональной областью, соответственно, посредством ковалентной связи или линкера, и

в котором любая одна из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи содержит аминокислотные замены в положениях 366 и 399, а другая содержит аминокислотные замены в положениях 351, 407 и 409, причем положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat на основе EU-индекса.

2. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по п. 1, в котором аминокислотные замены первой Fc-цепи и второй Fc-цепи представляют собой следующие:

- a) L351G, L351Y, L351V, L351P, L351D, L351E, L351K или L351W;
- b) T366L, T366P, T366W или T366V;
- c) D399C, D399N, D399I, D399G, D399R, D399T или D399A;
- d) Y407L, Y407A, Y407P, Y407F, Y407T или Y407H; и
- e) K409C, K409P, K409S, K409F, K409V, K409Q или K409R.

3. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по п. 1 или 2, в котором аминокислотные замены содержат:

a) замены T366L и D399R в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351E, Y407L и K409V в другой;

b) замены T366L и D399C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351G, Y407L и K409C в другой;

c) замены T366L и D399C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351Y, Y407A и K409P в другой;

d) замены T366P и D399N в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351V, Y407P и K409S в другой;

е) замены T366W и D399G в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351D, Y407P и K409S в другой;

ф) замены T366P и D399I в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и L351P, замены Y407F и K409F в другой;

г) замены T366V и D399T в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351K, Y407T и K409Q в другой;

h) замены T366L и D399A в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351W, Y407H и K409R в другой.

4. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-3, в котором аминокислотные замены содержат:

а) замены T366L и K409V в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351E, Y407L и D399R в другой;

б) замены T366L и K409C в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351G, Y407L и D399C в другой;

с) замены T366L и K409P в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351Y, Y407A и D399C в другой;

д) замены T366P и K409S в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351V, Y407P и D399N в другой;

е) замены T366W и K409S в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351D, Y407P и D399G в другой;

ф) замены T366P и K409F в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351P, Y407F и D399I в другой;

г) замены T366V и K409Q в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351K, Y407T и D399T в другой;

h) замены T366L и K409R в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи и замены L351W, Y407H и D399A в другой.

5. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-4, в котором аминокислоты в любой одной из первой Fc-цепи и второй Fc-цепи заменены посредством T366L и D399R, а аминокислоты другой заменены посредством L351E, Y407L и K409V.

6. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-5, в котором первая антигенсвязывающая функциональная область и вторая антигенсвязывающая функциональная область выбраны из Fab-фрагмента, scFv-фрагмента, Fv-фрагмента переменного домена и VHH-фрагмента переменной области тяжелой цепи антитела с тяжелыми цепями.

7. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-6, в котором обе, первая антигенсвязывающая функциональная область и вторая антигенсвязывающая функциональная область, представляют собой Fab-фрагменты.

8. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-6, в котором одна из первой антигенсвязывающей функциональной области и второй антигенсвязывающей функциональной области представляет собой Fab-фрагмент, а другая представляет собой scFv-фрагмент.

9. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по п. 7, в котором Fab-фрагмент содержит различные первую переменную область тяжелой цепи и вторую переменную область тяжелой цепи и различные первую переменную область легкой цепи и вторую переменную область легкой цепи.

10. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-9, причем первая Fc-цепь и первая антигенсвязывающая функциональная область, ковалентно связанная с ней, и вторая Fc-цепь и вторая антигенсвязывающая функциональная область, ковалентно связанная с ней, образуют менее 50 % гомодимеров из расчета на массу всех полипептидных цепей, когда присутствуют в растворе, в котором присутствует восстанавливающий агент и который не содержит другого полипептида в дополнение к первой Fc-цепи и первой антигенсвязывающей функциональной области, ковалентно связанной с ней, и второй Fc-цепи и второй антигенсвязывающей функциональной области, ковалентно связанной с ней.

11. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-10, в котором первая антигенсвязывающая функциональная область содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 6.

12. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-10, в котором вторая антигенсвязывающая функциональная область содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 12.

13. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по п. 11, в котором первая антигенсвязывающая функциональная область дополнительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 8.

14. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по п. 12, в котором вторая антигенсвязывающая функциональная область дополнительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 14.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14.

16. Выделенный полинуклеотид по п. 15, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты первой антигенсвязывающей функциональной области, содержит последовательности SEQ ID NO: 1 и 5.

17. Выделенный полинуклеотид по п. 15, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты второй антигенсвязывающей функциональной области, содержит последовательности SEQ ID NO: 9 и 11.

18. Выделенный полинуклеотид по п. 16, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты первой антигенсвязывающей функциональной области, дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 3 и 7.

19. Выделенный полинуклеотид по п. 17, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты второй антигенсвязывающей функциональной области, дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 3 и 13.

20. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 15-19.

21. Рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 20, причем экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор X0GC, полученный посредством модификации из pCDNA.

22. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по любому из пп. 15-19 или рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 20 или 21.

23. Клетка-хозяин по п. 22, которая выбрана из клетки эмбриональной почки человека HEK293 или клеток HEK293T, HEK293F, HEK293E, полученных посредством модификации из клетки HEK293, клетки яичника китайского хомяка CHO или клеток CHO-S, CHO-dhfr-, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных посредством модификации из клетки CHO, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством модификации из дрожжей, клетки насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

24. Композиция, содержащая биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14 или выделенный полинуклеотид по любому из пп. 15-19, или рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 20 или 21, или клетку-хозяин по п. 22 или 23 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Способ получения биспецифического антитела в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14, который предусматривает стадии:

1) экспрессии выделенного полинуклеотида по любому из пп. 15-19 или рекомбинантного экспрессионного вектора по п. 20 или 21, соответственно, в клетке-хозяине;

2) восстановления белков, соответственно экспрессированных в клетке-хозяине; и

3) смешивания восстановленных белков и окисления смеси.

26. Способ по п. 25, в котором клетку-хозяина выбирают из клетки эмбриональной почки человека НЕК293 или клеток НЕК293Т, НЕК293F, НЕК293Е, полученных посредством модификации из клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка СНО или клеток СНО-S, СНО-dhfr-, СНО/DG44, Exp1СНО, полученных посредством модификации из клетки СНО, клетки *Escherichia coli* или клеток *Escherichia coli* BL21, BL21(DE3), Rosetta, Origami, полученных посредством модификации из *Escherichia coli*, клетки дрожжей или клеток *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, полученных посредством модификации из дрожжей, клетки насекомого или клеток High5, SF9, полученных посредством модификации из клетки насекомого, растительной клетки, клетки молочной железы млекопитающего, соматической клетки.

27. Способ по п. 25 или 26, в котором стадия восстановления предусматривает 1) проведение стадии восстановления в присутствии восстанавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотрептола, трис(2-карбоксиэтил)фосфина или других химических производных, 2) удаление восстанавливающего агента.

28. Способ по любому из пп. 25-27, в котором стадия окисления представляет собой окисление на воздухе, а также предусматривает проведение реакции окисления в присутствии окисляющего агента, выбранного из группы, состоящей из L-дегидроаскорбиновой кислоты или ее химических производных.

29. Способ по любому из пп. 25-28, дополнительно предусматривающий стадию отделения и очистки.

30. Применение биспецифического антитела в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14 и/или выделенного полинуклеотида по любому из пп. 15-19, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора по п. 20 или 21, и/или клетки-хозяина по п. 22 или 23, и/или композиции по п. 24 для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

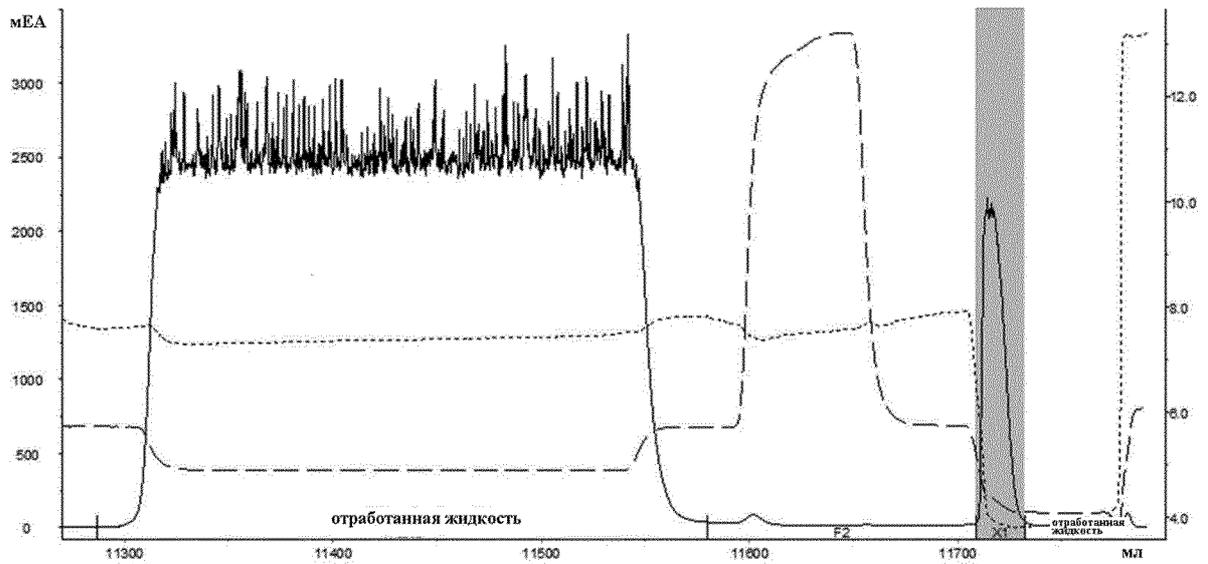
31. Биспецифическое антитело в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14, и/или выделенный полинуклеотид по любому из пп. 15-19, и/или рекомбинантный

экспрессионный вектор по п. 20 или 21, и/или клетка-хозяин по п. 22 или 23, и/или композиция по п. 24 для применения в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболевания у субъекта.

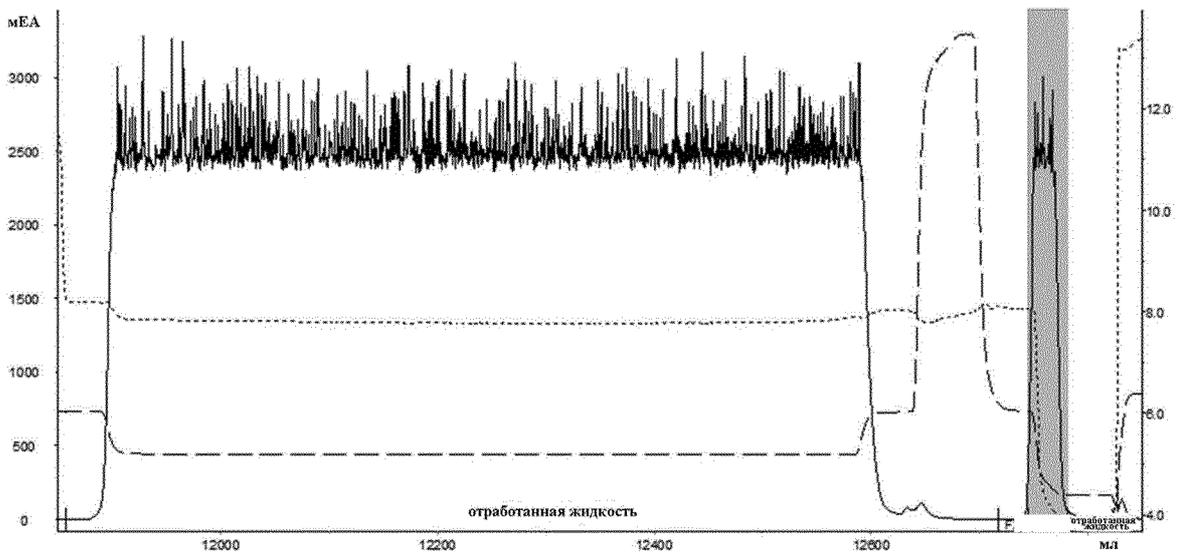
32. Способ профилактики и/или лечения заболевания, предусматривающий введение биспецифического антитела в форме гетеродимера по любому из пп. 1-14 и/или выделенного полинуклеотида по любому из пп. 15-19, и/или рекомбинантного экспрессионного вектора по п. 20 или 21, и/или клетки-хозяина по п. 22 или 23, и/или композиции по п. 24 субъекту, нуждающемуся в этом.

33. Применение по п. 30, биспецифическое антитело в форме гетеродимера, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин или композиция по п. 31, или способ по п. 32, причем субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.

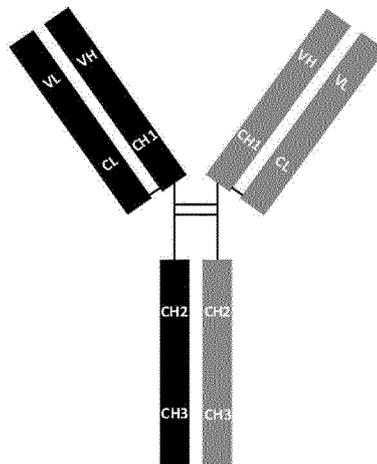
34. Применение по п. 30, биспецифическое антитело в форме гетеродимера, выделенный полинуклеотид, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин или композиция по п. 31, или способ по п. 32, причем заболевание выбрано из следующих опухолей: лейкоз, лимфома, миелома, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, назофарингеальная карцинома, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, рак печени, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак эндометрия, саркома матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, почечно-клеточный рак, меланома, мелкоклеточный рак легкого, рак костей.



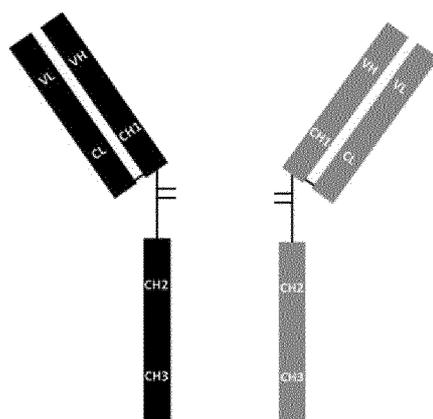
Фиг.1



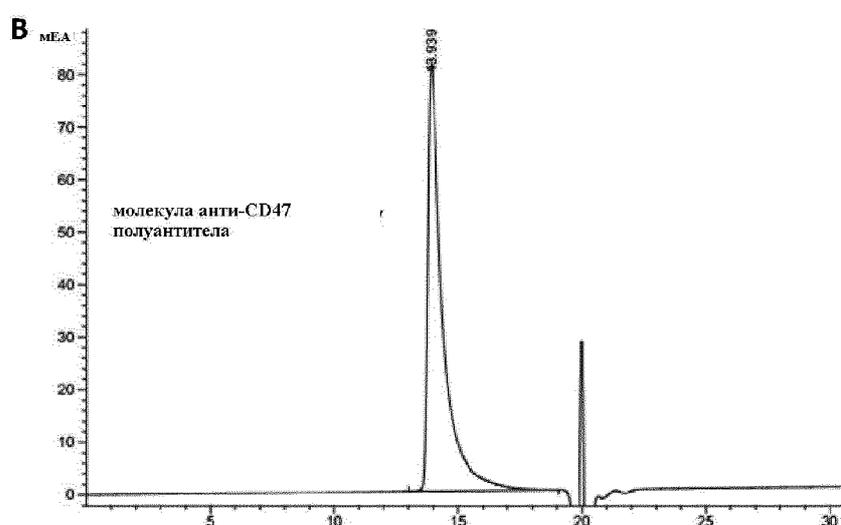
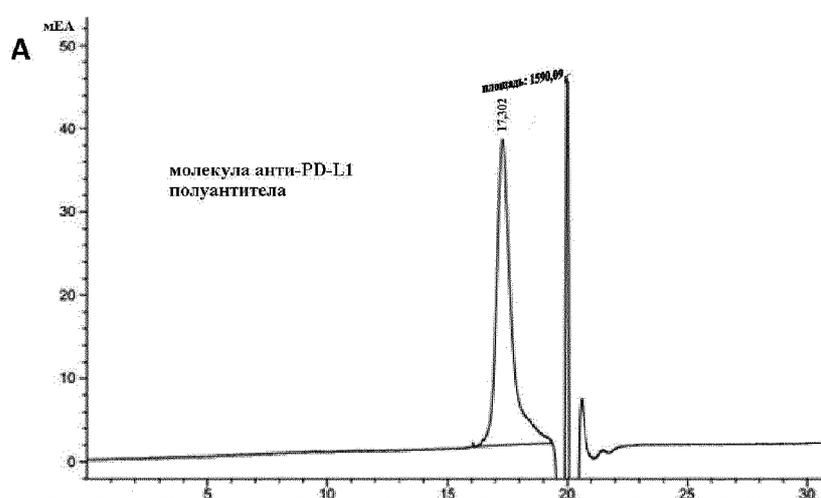
Фиг.2



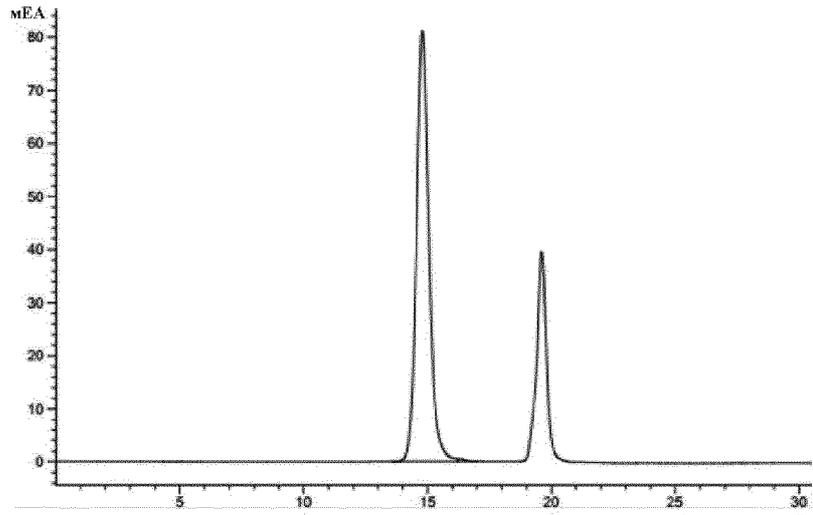
Фиг.3



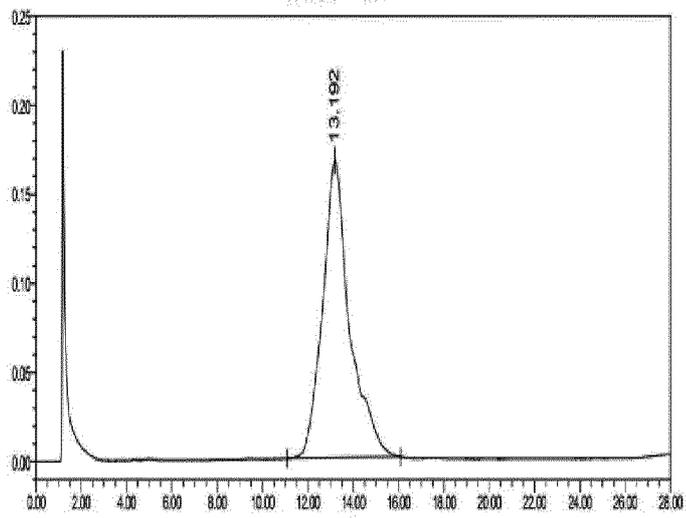
Фиг.4



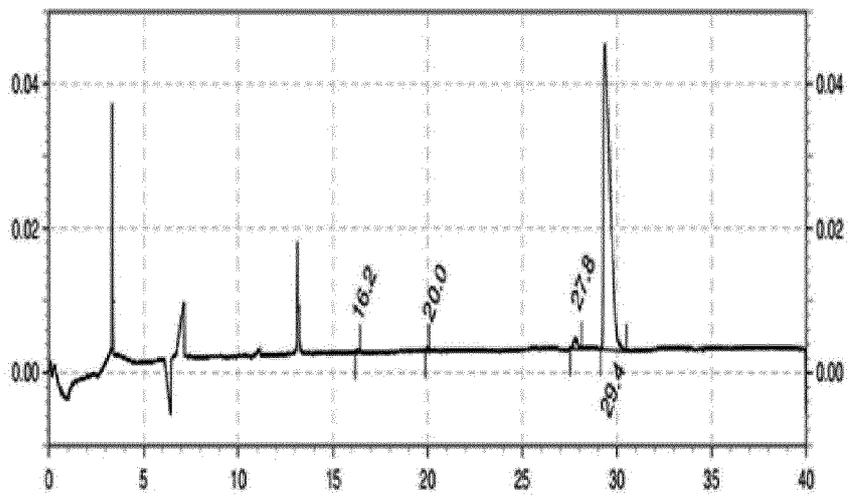
Фиг.5



Фиг.6

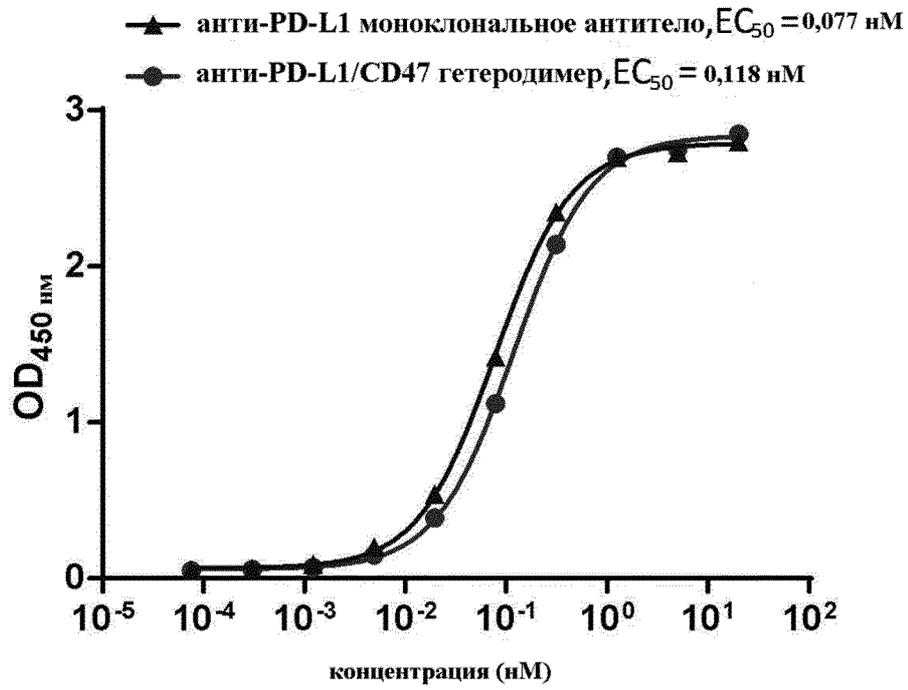


Фиг.7

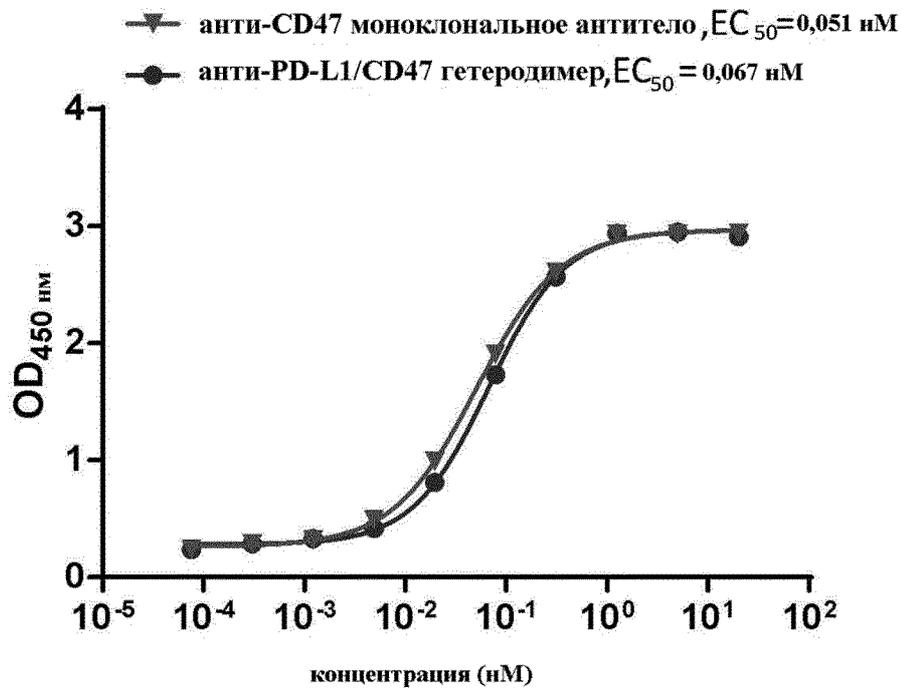


Фиг.8

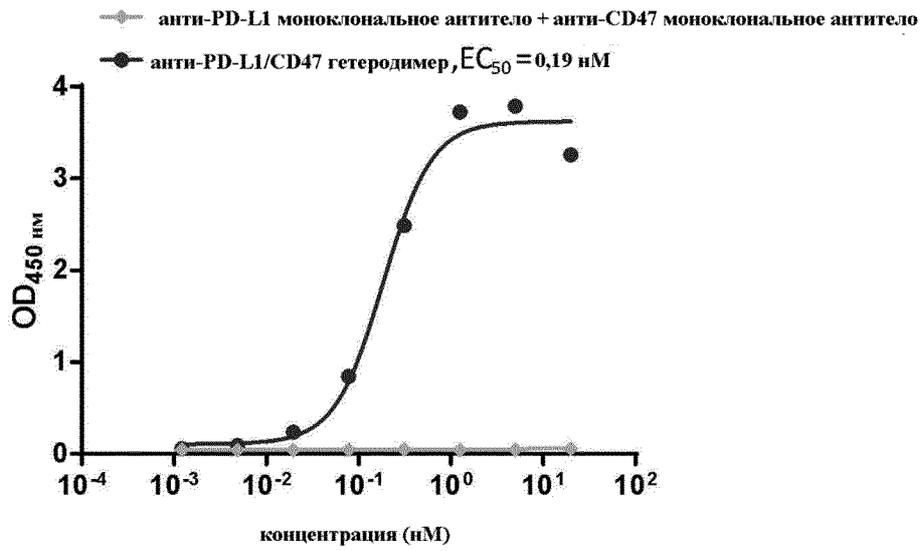
A



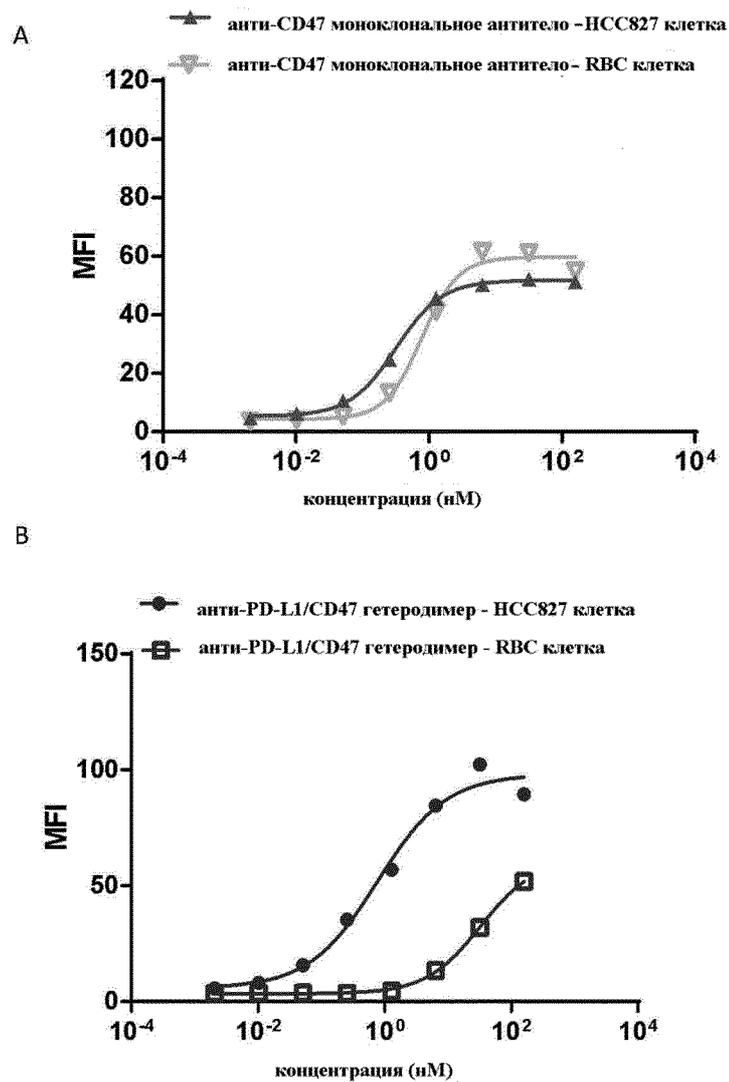
B



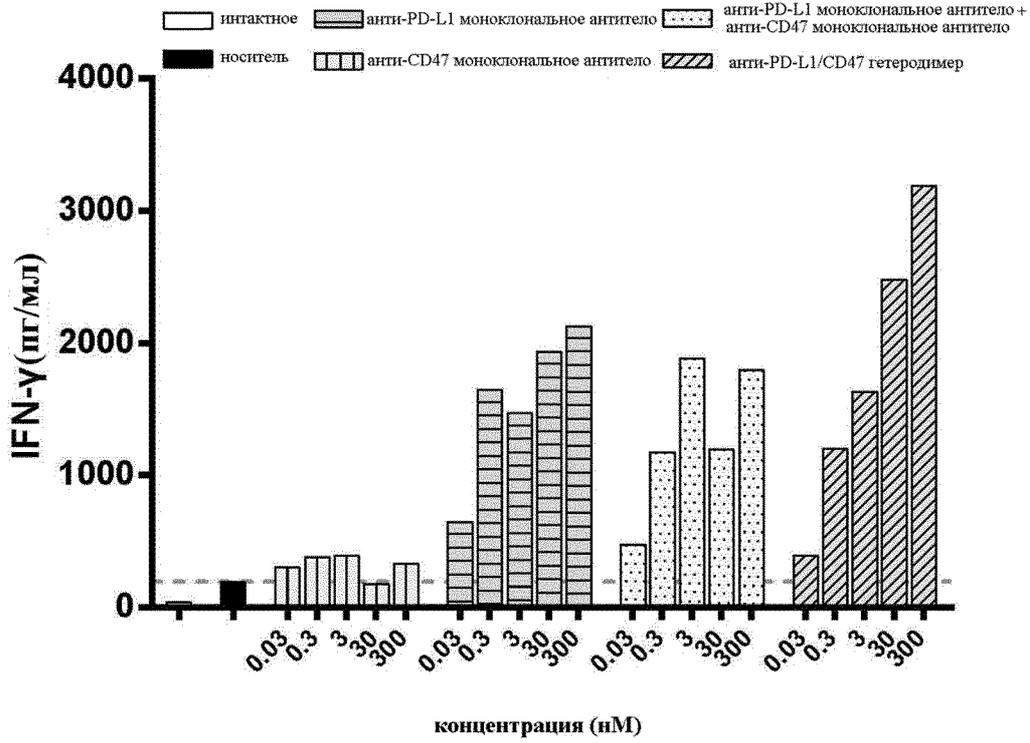
Фиг.9



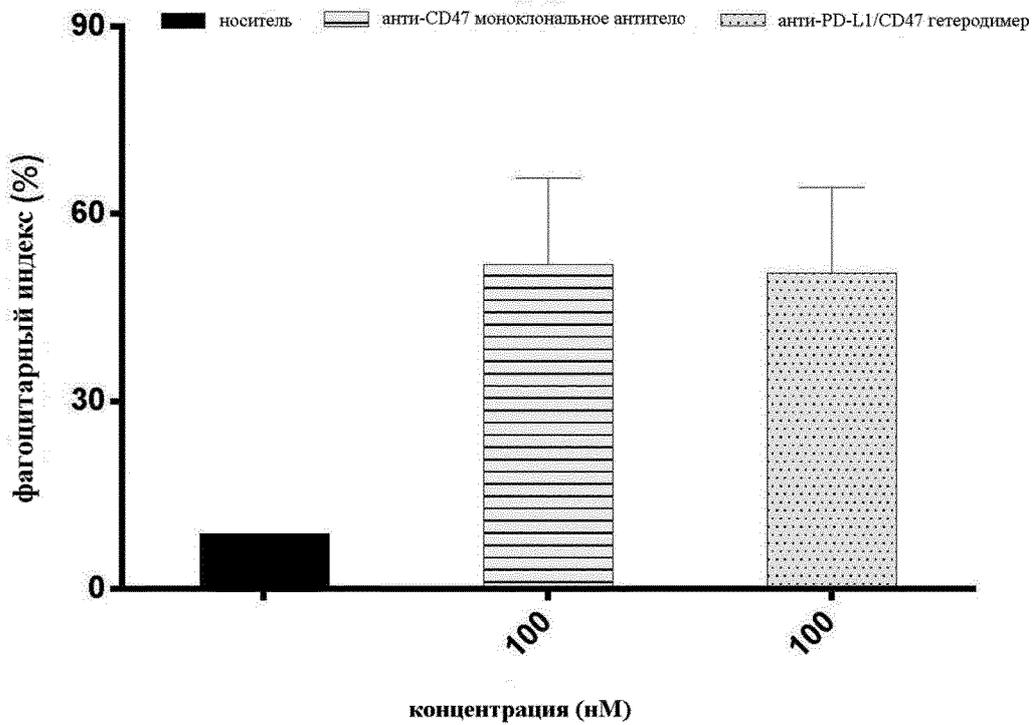
Фиг.10



Фиг.11



Фиг.12



Фиг.13