

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036314**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.26

(21) Номер заявки
201300256

(22) Дата подачи заявки
2011.08.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/32** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ВЫДЕЛЕННЫЕ АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА-3 (HER3) И ИХ ФРАГМЕНТЫ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТИ АНТИТЕЛА И ФРАГМЕНТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **61/375,408**

(32) **2010.08.20**

(33) **US**

(43) **2013.08.30**

(86) **PCT/EP2011/064407**

(87) **WO 2012/022814 2012.02.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Элис Винфрид (DE), Эттенберг Сет,
Гарнер Эндриью Пол (US), Хаубст
Николе, Кунц Кристиан Карстен
Зильвестер (DE), Райзингер Спрагью
Элизабет Анна (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2007077028
WO-A2-2006087637
WO-A2-2008019290**

FRANKLIN M.C. ET AL.: "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex", *CANCER CELL, CELL PRESS, US*, vol. 5, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 317-328, XP002372929, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/S1535-6108(04)00083-2, the whole document

CHO HYUN-SOO ET AL.: "Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether", *SCIENCE (WASHINGTON D C)*, vol. 297, no. 5585, 23 August 2002 (2002-08-23), pages 1330-1333, XP002662196, ISSN: 0036-8075. the whole document

BURGESS A.W. ET AL.: "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors", *MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US*, vol. 12, no. 3, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 541-552, XP002396190, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00350-2, the whole document, especially page 549, last full paragraph - page 550, second full paragraph

KANI KIAN ET AL.: "The extracellular domains of ErbB3 retain high ligand binding affinity at endosome pH and in the locked conformation", *BIOCHEMISTRY*, vol. 44, no. 48, December 2005 (2005-12), pages 15842-15857, XP002662197, ISSN: 0006-2960. the whole document

MCKAY BROWN ET AL.: "Tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2: A means of minimizing B cell wastage from somatic hypermutation?", *JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US*, vol. 156, no. 9, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3285-3291, XP002649029, ISSN: 0022-1767, the whole document

(57) В изобретении описаны варианты выделенных антител к HER3-рецептору или их фрагменты, фармацевтическая композиция, содержащая эти антитела или их фрагменты, а также их применение для лечения рака или для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

B1**036314****036314 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится, в целом, к антителам или их фрагментам, которые взаимодействуют с рецепторами семейства HER, например с HER3-рецептором. В частности, оно относится к антителам или их фрагментам, которые распознают конформационный эпитоп HER-рецептора (например, HER3), содержащий остатки из обоих доменов 2 и 4, что приводит к ингибированию как зависимой от лиганда, так и независимой от лиганда трансдукции сигнала.

Предпосылки создания изобретения

Рецептор человеческого эпидермального фактора роста-3 (ErbB3, который обозначают также как HER3) представляет собой рецепторную протеинтирозинкиназу и принадлежит к подсемейству рецепторных протеинтирозинкиназ эпидермального фактора роста (EGFR), которое включает также EGFR (HER1, ErbB1), HER2 (ErbB2, Neu) и HER4 (ErbB4) (Plowman и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 1990, сс. 4905-4909; Kraus и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1989, сс. 9193-9197; Kraus и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1993, сс. 2900-2904). Подобно прототипическому рецептору эпидермального фактора роста трансмембранный рецептор HER3 состоит из внеклеточного лигандсвязывающего домена (ECD), домена димеризации внутри ECD, трансмембранного домена, внутриклеточного домена, напоминающего протеинтирозинкиназный домен (TKD), и С-концевого домена фосфорилирования. В отличие от других представителей семейства HER киназный домен HER3 отличается очень низкой присущей ему киназной активностью.

Лиганды нейрегулин 1 (NRG) или нейрегулин 2 связываются с внеклеточным доменом HER3 и активируют опосредуемый рецептором путь передачи сигнала в результате усиления димеризации с другими партнёрами по димеризации, такими как HER2. Гетеродимеризация приводит к активации и трансфосфорилированию внутриклеточного домена HER3, и это способствует не только диверсификации сигнала, но также и к усилению сигнала. Кроме того, гетеродимеризация HER3 может происходить также без участия активирующих лигандов, и этот процесс, как правило, называют независимой от лиганда активацией HER3. Например, при высоких уровнях экспрессии HER2 в результате генной амплификации (например, при раке молочной железы, легкого, яичника или желудка) может происходить спонтанное образование димеров HER2/HER3. Считается, что в этой ситуации HER2/HER3 является наиболее активным ErbB-сигнальным димером и поэтому обладает высокой трансформирующей способностью.

Повышенный уровень HER3 обнаружен при некоторых типах рака, таких как рак молочной железы, легкого, желудочно-кишечный рак и рак поджелудочной железы. Важно отметить, что была обнаружена корреляция между экспрессией HER2/HER3 и переходом заболевания из неинвазивной в инвазивную стадию (Alimandi и др., Oncogene 10, 1995, сс. 1813-1821; DeFazio и др., Cancer 87, 2000, сс. 487-498; Naidu и др., Br. J. Cancer 78, 1988, сс. 1385-1390). Таким образом, существует необходимость в разработке агентов, которые взаимодействуют с опосредуемой HER3 передачей сигнала.

Краткое изложение сущности изобретения

При создании изобретения были обнаружены антигенсвязывающие белки (например, антитела или их фрагменты), которые связываются с конформационным эпитопом HER3-рецептора, содержащим аминокислотные остатки, входящие в домен 2 и домен 4 HER3. Указанное связывание антител или их фрагментов с доменом 2 и доменом 4 стабилизирует HER3-рецептор в неактивной или закрытой конформации, что приводит к ингибированию активации HER3. При создании изобретения неожиданно было установлено, что связывание антител или их фрагментов с указанным конформационным эпитопом блокирует как зависимые от лиганда (например, нейрегулина), так и независимые от лиганда пути передачи сигнала HER3. Кроме того, опосредуемое антителом ингибирование индуцируемой лигандом передачи сигнала имеет место без блокады связывания лиганда (т.е. как лиганд, так и антитело могут связываться с HER3), по-видимому, по той причине, что HER3 не может подвергаться конформационным перестройкам, необходимым для активации.

Таким образом, одним из объектов изобретения является выделенное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, которое(ые) включают:

- а) VH, которая содержит SEQ ID NO: 15, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- б) VH, которая содержит SEQ ID NO: 33, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 32, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- в) VH, которая содержит SEQ ID NO: 51, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- г) VH, которая содержит SEQ ID NO: 69, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 68, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- д) VH, которая содержит SEQ ID NO: 87, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 86, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- е) VH, которая содержит SEQ ID NO: 105, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 104, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- ж) VH, которая содержит SEQ ID NO: 123, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 122, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или

- з) VH, которая содержит SEQ ID NO: 141, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 140, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- и) VH, которая содержит SEQ ID NO: 159, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 158, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- к) VH, которая содержит SEQ ID NO: 177, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 176, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- л) VH, которая содержит SEQ ID NO: 195, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 194, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- м) VH, которая содержит SEQ ID NO: 213, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 212, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- н) VH, которая содержит SEQ ID NO: 231, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 230, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- о) VH, которая содержит SEQ ID NO: 249, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 248, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- п) VH, которая содержит SEQ ID NO: 267, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 266, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- р) VH, которая содержит SEQ ID NO: 285, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 284, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- с) VH, которая содержит SEQ ID NO: 303, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 302, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- т) VH, которая содержит SEQ ID NO: 321, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 320, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- у) VH, которая содержит SEQ ID NO: 339, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 338, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- ф) VH, которая содержит SEQ ID NO: 357, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 356, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- х) VH, которая содержит SEQ ID NO: 375, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 374, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%.

В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения выделенное антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 493 или последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 494.

В самом предпочтительном варианте выделенное антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 493, и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 494.

В другом варианте выделенное антитело или его фрагмент содержит:

- а) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 2; CDR2 SEQ ID NO: 3; CDR3 SEQ ID NO: 4; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 5; CDR2 SEQ ID NO: 6; и CDR3 SEQ ID NO: 7; или
- б) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 20; CDR2 SEQ ID NO: 21; CDR3 SEQ ID NO: 22; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 23; CDR2 SEQ ID NO: 24; и CDR3 SEQ ID NO: 25; или
- в) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 38; CDR2 SEQ ID NO: 39; CDR3 SEQ ID NO: 40; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 41; CDR2 SEQ ID NO: 42; и CDR3 SEQ ID NO: 43 или
- г) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 56; CDR2 SEQ ID NO: 57; CDR3 SEQ ID NO: 58; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 59; CDR2 SEQ ID NO: 60; и CDR3 SEQ ID NO: 61; или
- д) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 74; CDR2 SEQ ID NO: 75; CDR3 SEQ ID NO: 76; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 77; CDR2 SEQ ID NO: 78; и CDR3 SEQ ID NO: 79; или
- е) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 92; CDR2 SEQ ID NO: 93; CDR3 SEQ ID NO: 94; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 95; CDR2 SEQ ID NO: 96; и CDR3 SEQ ID NO: 97; или
- ж) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 110; CDR2 SEQ ID NO: 111; CDR3 SEQ ID NO: 112; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 113; CDR2 SEQ ID NO: 114; и CDR3 SEQ ID NO: 115; или
- з) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 128; CDR2 SEQ ID NO: 129; CDR3 SEQ ID NO: 130; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 131; CDR2 SEQ ID NO: 132; и CDR3 SEQ ID NO: 133; или
- и) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 146; CDR2 SEQ ID NO: 147; CDR3 SEQ ID NO: 148; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 149; CDR2 SEQ ID NO: 150; и CDR3 SEQ ID NO: 151; или

к) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 164; CDR2 SEQ ID NO: 165; CDR3 SEQ ID NO: 166; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 167; CDR2 SEQ ID NO: 168; и CDR3 SEQ ID NO: 169; или

л) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 182; CDR2 SEQ ID NO: 183; CDR3 SEQ ID NO: 184; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 185; CDR2 SEQ ID NO: 186; и CDR3 SEQ ID NO: 187; или

м) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 200; CDR2 SEQ ID NO: 201; CDR3 SEQ ID NO: 202; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 203; CDR2 SEQ ID NO: 204; и CDR3 SEQ ID NO: 205; или

н) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 218; CDR2 SEQ ID NO: 219; CDR3 SEQ ID NO: 220; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 221; CDR2 SEQ ID NO: 222; и CDR3 SEQ ID NO: 223; или

о) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 236; CDR2 SEQ ID NO: 237; CDR3 SEQ ID NO: 238; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 239; CDR2 SEQ ID NO: 240; и CDR3 SEQ ID NO: 241; или

п) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 254; CDR2 SEQ ID NO: 255; CDR3 SEQ ID NO: 256; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 257; CDR2 SEQ ID NO: 258; и CDR3 SEQ ID NO: 259; или

р) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 272; CDR2 SEQ ID NO: 273; CDR3 SEQ ID NO: 274; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 275; CDR2 SEQ ID NO: 276; и CDR3 SEQ ID NO: 277; или

с) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 290; CDR2 SEQ ID NO: 291; CDR3 SEQ ID NO: 292; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 293; CDR2 SEQ ID NO: 294; и CDR3 SEQ ID NO: 295; или

т) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 308; CDR2 SEQ ID NO: 309; CDR3 SEQ ID NO: 310; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 311; CDR2 SEQ ID NO: 312; и CDR3 SEQ ID NO: 313; или

у) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 326; CDR2 SEQ ID NO: 327; CDR3 SEQ ID NO: 328; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 329; CDR2 SEQ ID NO: 330; и CDR3 SEQ ID NO: 331; или

ф) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 344; CDR2 SEQ ID NO: 345; CDR3 SEQ ID NO: 346; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 347; CDR2 SEQ ID NO: 348; и CDR3 SEQ ID NO: 349; или

х) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 362; CDR2 SEQ ID NO: 363; CDR3 SEQ ID NO: 364; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 365; CDR2 SEQ ID NO: 366; и CDR3 SEQ ID NO: 367.

Фрагмент антитела может выбираться из группы, состоящей из Fab, F(ab)₂', F(ab)₂', scFv, VHH, VH, VL, dAb.

Вторым объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения рака, отличающегося экспрессией HER3, включающая антитело или фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

Причем эта композиция дополнительно может содержать терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора HER1, ингибитора HER2, ингибитора HER3, ингибитора HER4, ингибитора mTOR и ингибитора PI3-киназы.

В предпочтительном варианте она дополнительно содержит терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора HER1, выбранного из группы, состоящей из матузумаба (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаба, Vertibix®/панитумумаба, mAb 806, нимотузумаба, Iressa®/гефитиниба, CI-1033 (PD183805), лапатиниба (GW-572016), Tykerb®/лапатиниба дитозилата, Tarceva®/эрлотиниба-HCl (OSI-774), PKI-166 и Tovok®; ингибитор HER2, выбранный из группы, состоящей из пертузумаба, трастузумаба, MM-111, нератиниба, лапатиниба или лапатиниба дитозилата/Tykerb®; ингибитор HER3, выбранный из группы, состоящей из MM-121, MM-111, IB4C3, 2DID12 (фирма U3 Pharma AG), AMG888 (фирма Amgen), AV-203 (фирма Aveo), MENH7945A (фирма Genentech) и малых молекул, которые ингибируют HER3; и ингибитор HER4.

В еще одном предпочтительном варианте композиция дополнительно содержит терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора mTOR, выбранного из группы, состоящей из темсиролимуса/Torisel®, ридафоролимуса/дефоролимуса, AP23573, MK8669, эверолимуса/Affinitor®.

Композиция также дополнительно может содержать терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящий из ингибитора PI3-киназы, выбранного из группы, состоящей из GDC 0941, BEZ235, BMK120 и BYL719.

Третьим объектом данного изобретения является применение антитела или его фрагмента для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, множественной мие-

ломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, острого миелолейкоза, хронического миелолейкоза, остеосаркомы, плоскоклеточной карциномы, опухоли оболочки периферических нервов, шванномы, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, эзофагеального рака, глиобластомы, светлоклеточной саркомы мягкой ткани, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки и меланомы.

Кроме того, особенно предпочтительно применение антитела или его фрагмента для лечения рака молочной железы.

Следующим объектом данного изобретения является применение антитела или его фрагмента для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, где рак выбирается из группы, состоящей из рака молочной железы, колоректального рака, рака легкого, множественной миеломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, острого миелолейкоза, хронического миелолейкоза, остеосаркомы, плоскоклеточной карциномы, опухоли оболочки периферических нервов, шванномы, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, эзофагеального рака, глиобластомы, светлоклеточной саркомы мягкой ткани, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки и меланомы.

Еще одним объектом данного изобретения является выделенное моноклональное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, содержащее в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 128; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 129; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 130; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 131; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 132; и CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 133.

Наконец последним объектом данного изобретения является выделенное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, включающее VH, содержащую SEQ ID NO: 141, и VL, содержащую SEQ ID NO: 140.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - репрезентативные кривые, полученные с помощью SET (титрование уравновешенного раствора), для антитела MOR10701 при использовании HER3 человека, мыши, крысы и обезьяны цинолгус (супо);

на фиг. 2 - результаты оценки связывания с клетками линии SK-Br-3, полученные с помощью FACS-титрования;

на фиг. 3 - полученные с помощью ELISA результаты, касающиеся домена связывания HER3;

на фиг. 4 - результаты эпиптопного картирования на основе обмена водорода на дейтерий (замещение водорода дейтерием). А) Пептиды ECD HER3, выделенные после HDX-MS-анализа (МС-анализ обмена водорода на дейтерий), обозначены штриховыми линиями. Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования выделены ярким цветом. Б) Данные об относительной степени дейтеризации, обнаруженной в пептидах, которые идентифицировали с помощью МС. В) Защищенные остатки, картированные в опубликованной кристаллической структуре HER3;

на фиг. 5: А) - изображение поверхности кристаллической структуры HER3/MOR09823 и HER3/MOR09825 в рентгеновских лучах. HER3 (окрашен более светлым серым цветом) находится в закрытой конформации, а MOR09823 или MOR09825 (окрашены более темным серым цветом) связываются с обоими доменами 2 и 4; Б) - изображение поверхности HER3 из структуры HER3/MOR09823, представленное в такой же ориентации, что и (А). MOR09823 для простоты не показан; В) - структура HER3/MOR09823, проиллюстрированная в виде ленточной структуры, повернутой на угол 90° относительно панелей (А), (Б) и (Г); Г) - ленточное изображение неактивной конформации HER3, распознаваемой Fab-фрагментом MOR09823, с увеличенным изображением поверхности раздела домена 2/домена 4, ярким цветом выделены остатки HER3, расположенные в пределах 5Å от Fab; Д) - результаты связывания мутантного HER3/MOR10703, полученные с помощью ELISA-титрования;

на фиг. 6 - данные о ингибировании индуцируемого лигандом (А) или независимого от лиганда (Б) фосфорилирования HER3;

на фиг. 7 - данные о ингибировании зависящих от HER3 расположенных в прямом направлении путей передачи сигнала в клеточных линиях, в которых происходит амплификация HER2;

на фиг. 8 - данные о влиянии ингибирования HER3 на рост клеток; А) BT-474-клетки и Б) стимулированные нейрегулином MCF7-клетки;

на фиг. 9 - данные о воздействии MOR09823 и MOR09825 на связывание нейрегулина с MCF7-клетками;

на фиг. 10 - данные о влиянии связывания MOR09823 на образование комплекса HER3/нейрегулин при оценке с помощью Biacore™. Без антител (черные прямоугольники), MOR09823 (белые прямоугольники, 105,5 (серые прямоугольники) и применявшийся в качестве контроля IgG (заштрихованные прямоугольники);

на фиг. 11 - данные об опосредованном MOR09823 ингибировании (А) независимой от лиганда

(BT-474) и (Б) зависимой от лиганда (ВхРС3) передачи сигнала HER3 *in vivo*.,

на фиг. 12 - данные о влиянии MOR10701 и MOR10703 на рост опухоли линии BT-474;

на фиг. 13 - данные о влиянии MOR10701 и MOR10703 на рост опухоли линии ВхРС3;

на фиг. 14 - изоболограммы, описывающие воздействие *in vitro* комбинации MOR10703 с лекарственными средствами (А) MOR09823/трастузумаб, (Б) MOR09823/лапатиниб, (В) MOR10703/BEZ235, (Г) MOR10703/ВКМ120, (Д) MOR10703/BYL719, (Е) MOR10703/RAD001, (Ж) MOR10703/цетуксимаб и (З) MOR10703/эрлотиниб;

на фиг. 15 - данные о воздействии *in vivo* комбинаций MOR10701 или MOR10703 с (А) трастузумабом и (Б) эрлотинибом на клетки BT-474 и L3.3.

Подробное описание изобретения

Определения

С целью лучшего понимания настоящего изобретения предварительно представлено определение некоторых понятий. Дополнительные определения представлены в подробном описании изобретения.

Понятие "путь трансдукции сигнала" или "сигнальная активность" относится к биохимической причинной взаимосвязи, как правило, инициируемой белок-белковым взаимодействием, такой как связывание фактора роста с рецептором, приводящее к передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. В случае HER3 передача сигнала включает специфическое фосфорилирование одного или нескольких остатков тирозина, серина или треонина в одном или нескольких белках, участвующих в каскаде реакций, обуславливающих трансдукцию сигнала. Предпоследние процессы, как правило, включают связанные с ядром события, которые приводят к изменению экспрессии гена.

"HER-рецептор" представляет собой рецепторную протеинтирозинкиназу, относящуюся к семейству HER-рецепторов, и включает рецепторы EGFR, HER2, HER3 и HER4 и других представителей этого семейства, которые будут идентифицированы в будущем. HER-рецептор, в целом, содержит внеклеточный домен, который может связываться с лигандом HER; липофильный трансмембранный домен; консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен; и расположенный на карбоксильном конце сигнальный домен, который несет несколько остатков тирозина, которые могут фосфорилироваться. Предпочтительно HER-рецептор имеет нативную последовательность человеческого HER-рецептора.

Понятия "HER1", "ErbB1", "рецептор эпидермального фактора роста" и "EGFR" в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо, и они относятся к EGFR, описанному, например, у Carpenter и др., *Ann. Rev. Biochem.* 56, 1987, сс. 881-914, включая его встречающиеся в естественных условиях мутантные формы (например, делеционный мутант EGFR, описанный у Humphrey и др., *PNAS (USA)* 87, 1990, сс. 4207-4211). Понятие "erbB1" относится к гену, кодирующему белковый продукт, представляющий собой EGFR.

В контексте настоящего описания понятия "HER2" и "ErbB2" применяют взаимозаменяемо, и они относятся к человеческому белку HER2, описанному, например, у Semba и др., *PNAS (USA)* 82, 1985, сс. 6497-6501 и Yamamoto и др., *Nature* 319, 1986, сс. 230-234 (регистрационный номер Genebank X03363). Понятие "erbB2" относится к гену, кодирующему человеческий ErbB2, "neu" относится к гену, кодирующему крысиный белок p185^{neu}.

В контексте настоящего описания понятия "HER4" и "ErbB4" относятся к рецепторному полипептиду, описанному, например, в заявке на европейский патент № 599274; у Plowman и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, сс. 1746-1750; и у Plowman и др., *Nature*, 366, 1993, сс. 473-475, включая его изоформы, описанные, например, в WO 99/19488, которая была опубликована 22 апреля 1999 г.

Понятие "HER3" или "HER3-рецептор", а также "ErbB3", в контексте настоящего описания относится к белку HER3 млекопитающих, а понятие "her3" или "erbB3" относится к гену her3 млекопитающих. Предпочтительный белок HER3 представляет собой человеческий белок HER3, который присутствует в клеточной мембране клетки. Человеческий ген her3 описан в US № 5480968 и у Plowman и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, сс. 4905-4909.

Человеческий HER3, регистрационный № NP_001973 (человеческий), имеет последовательность, представленную ниже в SEQ ID NO: 1. Вся номенклатура представлена для полноразмерного незрелого HER3 (аминокислоты 1-1342). Незрелый HER3 расщепляется между положениями 19 и 20 с образованием зрелого белка HER3 (аминокислоты 20-1342)

mrandalqvl gllfslargs evgnsqavcp gtlnglsvtg daenqyqtly klyercevmm
 gnleivltgh nadlsflqwi revtgyvlva mnefstlplp nlrvvrgtqv ydgkfaifvm
 lnyntnssha lrqlrltqlt eilsggyvie kndklchmdt idwrdivrdr daeivvkdng
 rscppchevc kgrcwpggse dcqtltktic apqcngchcfcg pnpnqcchde caggcsgpqp
 tdcfacrhfn dsgacvprep qplvynkltf qlepnphtky qyggvcvasc phnfvvdqts
 cvracppdkm evdknglkmc epcggclpka cegtgsgrf qtvdssnidg fvnctkilgn
 ldflitgln dpwhkipald peklnvrtv reitgylng swpphmhfs vfnlittigg
 rslnrgfsl limknlvts lgfrslkeis agriyisanr qlcyhhslnw tkvlrgptee
 rldikhnrpr rdcvaegkvc dplcsggcw gpgpgqlsc rnysrggv cv thcnflngep
 refaheaecf schpecqpmc gtatcngsgs dtcaqcahfr dgphcvsscp hgvlgakgpi
 ykypdvqnc rpchenctqg ckgpelqdel gqtlvligkt hltmaltvia glvvifmmlg
 gtflywrgrr iqnkramrry lergesiepl dpsekankvl arifketelr klkvlsgsvf
 gtvhkgvwip egesikipvc ikviedksgr qsfqavtdhm laigsldhah ivrllglcpg
 sslqlvtqyl plgslldhvr qhrgalgpql llnwgvqiaq gmyyleehgm vhrnlaarnv
 llkspsvqv adfgvadllp pddkqlyse aktpikwmal esihfgkyth qsdvwsygv
 vwelmtfgae pyagrlaev pdllekgerl aqpqictidv ymvmvkcwmi denirptfke
 laneftrmar dpprylvikr esgpgiapgp ephgltnkkl eevelepeld lldleaeed
 nlattlgsa lslpvgtlr prgsqllsp ssgympmnqg nlgescquesa vsgssercpr
 pvsllhpmprg classesegh vtgseaelqe kvsmcrsr rrsprprgds ayhsqrhsl
 tptvplsppg leedvngyv mpdthlkgtp ssregtlssv glssvlgteee dedeeyeym
 nrrrrhspph pprssleel gyeymdvgsd lsaslgstqs cplhpvpimp tagttdedy
 eymnrqrdgg gpggdyaamg acpaseqgye emrafqgpg qaphvhyarl ktlrsleatd
 safdnpywh srlfpkanaq rt (SEQ ID NO: 1)

Понятие "лиганд HER" в контексте настоящего описания относится к полипептидам, которые связываются и активируют HER-рецепторы, такие как HER1, HER2, HER3 и HER4. Примерами лигандов HER являются (но, не ограничиваясь только ими) нейрегулин 1 (NRG), нейрегулин 2, нейрегулин 3, нейрегулин 4, бетацеллюлин, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста, эпирегулин, эпидермальный фактор роста, амфирегулин и трансформирующий фактор роста альфа. Понятие включает биологически активные фрагменты и/или варианты встречающегося в естественных условиях полипептида.

Понятие "лиганд HER3" в контексте настоящего описания относится к полипептидам, которые связываются и активируют HER3. Примерами лигандов HER3 являются (но, не ограничиваясь только ими) нейрегулин 1 (NRG) и нейрегулин 2, бетацеллюлин, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста и эпирегулин. Понятие включает биологически активные фрагменты и/или варианты встречающегося в естественных условиях полипептида.

"Белковый комплекс HER-HER" представляет собой нековалентно ассоциированный олигомер, содержащий рецепторы HER в любой комбинации (например, HER1-HER2, HER1-HER3, HER1-HER4, HER2-HER3, HER3-HER4 и т.п.). Этот комплекс может образовываться, когда клетку, экспрессирующую оба указанных рецептора, обрабатывают лигандом HER, например NRG, или когда HER-рецептор является активным, или когда происходит его сверхэкспрессия.

"Белковый комплекс HER2-HER3" представляет собой нековалентно ассоциированный олигомер, содержащий HER2-рецептор и HER3-рецептор. Этот комплекс может образовываться в том случае, когда клетку, экспрессирующую оба указанных рецептора, обрабатывают лигандом HER3, например NRG, или когда HER2 является активным/сверхэкспрессируется.

Понятие "активность HER3" или "активация HER3" в контексте настоящего описания относится к

повышению олигомеризации (например, увеличению количества содержащих HER3 комплексов), фосфорилирования HER3, конформационных перегруппировок (например, индуцируемых лигандами) и опосредуемой HER3 передачи сигнала в прямом направлении.

Понятие "стабилизация" или "стабилизированный" в контексте HER3 относится к антителу или его фрагменту, которое/который непосредственно поддерживает (запирает, привязывает, удерживает, предпочтительно связывает, "обладает предрасположенностью к") неактивное состояние или неактивную конформацию HER3, не блокируя при этом связывание лиганда с HER3, но таким образом, чтобы связывание лиганда уже не могло активировать HER3. Описанные в примерах анализы, например Viacore-анализ, можно применять для оценки связывания лиганда со стабилизированным HER3-рецептором.

Понятие "зависимая от лиганда передача сигнала" в контексте настоящего описания относится к активации HER (например, HER3) с помощью лиганда. Активация HER3 проявляется по повышенной олигомеризации (например, гетеродимеризации) и/или фосфорилированию HER3, в результате чего активируются расположенные в прямом направлении пути передачи сигнала (например, PI3K). Антитело или его фрагмент может статистически значимо снижать количество фосфорилированных HER3 в стимулированной клетке, обработанной антигенсвязывающим белком (например, антителом), по сравнению с необработанной (контрольной) клеткой, при оценке с помощью анализов, описанных в примерах. Экспрессирующие HER3 клетки могут представлять собой встречающуюся в естественных условиях клеточную линию (например, MCF7), или их можно получать рекомбинантно путем интродукции нуклеиновых кислот, которые кодируют белок HER3, в клетке-хозяине.

Стимуляцию клетки можно осуществлять либо путем экзогенного добавления активирующего HER3 лиганда, либо путем эндогенной экспрессии активирующего лиганда.

Антитело или его фрагмент, которое/который "снижает индуцируемую нейрегулином активацию HER3 в клетке" относится к антителу или его фрагменту, которое/который статистически значимо снижает фосфорилирование тирозина HER3 по сравнению с необработанной (контрольной) клеткой, при оценке с помощью анализов, описанных в примерах. Определение этого может основываться на уровнях фосфотирозина в HER3 после обработки HER3 NRG и представляющим интерес антителом. Экспрессирующая HER3 клетка может представлять собой встречающуюся в естественных условиях клетку или клеточную линию (например, MCF7) или ее можно получать рекомбинантно.

Понятие "независимая от лиганда передача сигнала" в контексте настоящего описания относится к клеточной активности HER3 (например, фосфорилированию), для которой не требуется связывание с лигандом. Например, независимая от лиганда активация HER3 может быть результатом сверхэкспрессии HER2 или активирующих мутаций в партнерах HER3 по гетеродимеризации, таких как EGFR и HER2. Антитело или его фрагмент может статистически значимо снижать количество фосфорилированных HER3 в клетке, обработанной антигенсвязывающим белком (например, антителом), по сравнению с необработанной (контрольной) клеткой. Экспрессирующая HER3 клетка может представлять собой встречающуюся в естественных условиях клеточную линию (например, SK-Bv-3), или ее можно получать рекомбинантно путем интродукции нуклеиновых кислот, которые кодируют белок HER3, в клетку-хозяина.

Понятие "блокирует" в контексте настоящего описания относится к остановке или предотвращению взаимодействия или процесса, например, прекращение зависимой от лиганда или независимой от лиганда передачи сигнала.

Понятие "распознает" в контексте настоящего описания относится к антителу или его фрагменту, которое/который обнаруживает и взаимодействует (например, связывается) с его конформационным эпитопом.

Понятие "конкурентно связывается" в контексте настоящего описания относится к лиганду HER, который может связываться с сайтом связывания лиганда на HER-рецепторе наряду с антителом к HER. Это означает, что и лиганд, и антитело могут одновременно связываться с HER-рецептором. Например, только с целью иллюстрации, лиганд HER3 NRG может связываться с HER3-рецептором наряду с антителом к HER3. Анализ, предназначенный для оценки конкурентного связывания лиганда и антитела, описан в разделе "Примеры" (например, Viacore-анализ).

Понятие "не обладающий способностью" в контексте настоящего описания относится к антителу или его фрагменту, которое/который не могут осуществлять конкретную функцию. Например, антитело или его фрагмент, которое/который "не обладает способностью активировать трансдукцию сигнала", представляет собой антитело или его фрагмент, которое/который не запускает трансдукцию сигнала; антитело или его фрагмент, которое/который "не обладает способностью индуцировать конформационное изменение", представляет собой антитело или его фрагмент, которое/который не вызывает структурное изменение HER-рецептора; антитело или его фрагмент, которое/который стабилизирует HER-рецептор в неактивном состоянии, таком, что HER-рецептор "не обладает способностью к димеризации", представляет собой антитело или его фрагмент, которое/который не образует белок-белковые комплексы.

Понятие "антитело" в контексте настоящего описания относится к полным антителам, которые взаимодействуют (например, путем связывания, создания стерической помехи, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом HER3 и ингибируют трансдукцию

сигнала. Встречающееся в естественных условиях "антитело" представляет собой гликопротеин, который содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные друг с другом дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, т.е. CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, т.е. CL. VH- и VL-области можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, которые называют гипервариабельными участками (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, которые называют каркасными участками (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, которые расположены в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Понятие "антитело" относится, например, к моноклональным антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, камелизированным антителам, химерным антителам, одноцепочечным Fv (scFv), связанным дисульфидным мостиком Fv (sdFv), Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам и антиидиотипическим (анти-Id) антителам (включая, например, анти-Id антитела к антителам, предлагаемым в изобретении) и к эпитопсвязывающим фрагментам любого из них. Антитела могут относиться к любому изотипу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу.

Как легкие, так и тяжелые цепи подразделяют на области структурной и функциональной гомологии. Понятия "константная" и "переменная" применяют для определения функции. При этом принято считать, что участки переменных доменов легких (VL) и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обуславливают важные биологические свойства, такие как секреция, прохождение через плаценту, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Принято, что нумерация доменов константных областей возрастает по мере их удаления от антигенсвязывающего центра или аминоконца антитела. N-конец представляет собой переменную область, а на C-конце находится константная область; CH3- и CL-домены фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Понятие "фрагмент антитела" в контексте настоящего описания относится к одному или нескольким участкам антитела, который(ые) сохраняет(ют) способность специфически взаимодействовать (например, путем связывания, стерической помехи, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом HER3 и ингибировать трансдукцию сигнала. Примерами связывающих фрагментов являются (но, не ограничиваясь только ими) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; F(ab)₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, который состоит из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward и др., Nature 341, 1989, сс. 544-546), который состоит из VH-домена; и выделенный гипервариабельный участок (CDR).

Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, т.е. VL и VH, кодируются различными генами, их можно соединять с помощью методов рекомбинации синтетическим линкером, который позволяет создавать из них одну белковую цепь, в которой пара VL- и VH-областей формирует одновалентные молекулы (известные под названием одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426; и Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1988, сс. 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также подпадают под понятие "фрагмент антитела". Указанные фрагменты антитела получают с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу в отношении возможности их применения, аналогичного применению интактных антител.

К фрагментам антитела относятся также однодоменные антитела, макситела, минитела, интретела, диантитела (диабоди, димерные) антитела, тримерные антитела, тетрамерные антитела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger и Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 2005, сс. 1126-1136). Фрагменты антител можно трансплантировать в каркасы, основой которых являются полипептиды, такие как фибронектин типа III (Fn3) (см. US № 6703199, в котором описаны моноантитела, основой которых является полипептид фибронектина).

Фрагменты антител могут входить также в одноцепочечные молекулы, которые содержат пару расположенных в виде тандема Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые в сочетании с комплементарными полипептидами легкой цепи формируют пару антигенсвязывающих областей (Zapata и др., Protein Eng. 8(10), 1995, сс. 1057-1062; и US № 5641870).

Понятие "эпитоп" означает любую белковую детерминанту, которая обладает способностью специфически связываться с иммуноглобулином или иным образом взаимодействовать с молекулой. Эпитоп-

ные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углеводов или сахаров, и, как правило, имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным".

Понятие "линейный эпитоп" относится к эпитопу в случае, когда все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно). Если требуемый эпитоп антигена определен, то можно создавать антитела к этому эпитопу, например, с помощью методов, описанных в настоящем изобретении. В альтернативном варианте в процессе поиска, создания и характеристики антител можно получать информацию о приемлемых эпитопах. Затем на основе этой информации можно осуществлять конкурентный скрининг антител в отношении связывания с одним и тем же эпитопом. Применяемый для этой цели подход включает осуществления опытов по перекрестной конкуренции для поиска антител, которые конкурентно связываются с другим антителом, например антител, которые конкурируют за связывание с антигеном. Высокопроизводительный процесс группировки ("биннинга") антител на основе их перекрестной конкуренции описан в международной заявке на патент WO 2003/48731. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, практически все, с чем может специфически связываться антитело, можно рассматривать как эпитоп. Эпитоп может содержать те остатки, с которыми связывается антитело.

Понятие "конформационный эпитоп" относится к эпитопу, состоящему из не расположенных непрерывно аминокислот, которые объединены в трехмерную конформацию. В конформационном эпитопе точки взаимодействия расположены на аминокислотных остатках белка, которые отделены друг от друга. Конформационный эпитоп может состоять из (I) аминокислотных остатков HER3 265-277 и 315 (из домена 2) и (II) аминокислотных остатков HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (из домена 4), которые представлены в SEQ ID NO: 1, или их поднабор. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, пространство, занятое остатком или боковой цепью, который/которая определяет форму молекулы, помогает определять, что представляет собой эпитоп.

Как правило, антитела, специфические в отношении конкретного антигена-мишени, должны главным образом распознавать эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Области данного полипептида, которые включают эпитоп, можно идентифицировать с помощью любой из методик эпитопного картирования, которые хорошо известны в данной области (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, под ред. Glenn E. Morris, изд-во Humana Press, Totowa, New Jersey, т. 66, 1996). Например, линейные эпитопы можно определять, в частности, осуществляя одновременный синтез большого количества пептидов на твердых подложках, где пептиды соответствуют участкам молекулы белка, и подвергая пептиды взаимодействию с антителами, оставляя пептиды прикрепленными к подложкам. Указанные методики известны в данной области и описаны, например, в US № 4708871; у Geysen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 1984, сс. 3998-4002; Geysen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1985, сс. 78-182; Geysen и др., *Mol. Immunol.* 23, 1986, сс. 709-715. Кроме того, конформационные эпитопы легко идентифицировать путем определения пространственной конформации аминокислот, например, таким методом, как обмен водород/дейтерий, рентгеновская хроматография и двумерный ядерный магнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols*, выше). Антигенные области белков можно идентифицировать также с использованием стандартных кривых антигенности и средней гидрофобности остатков, для расчета которых можно применять, например, пакет программ Omega, версия 1.0 фирмы Oxford Molecular Group. В этой компьютерной программе использован метод Хоппа/Вудса (Hopp и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1981, сс. 3824-3828) для определения профилей антигенности и метод Кайта-Дулиттла (Kyte и др., *J. Mol. Biol.* 157, 1982, сс. 105-132) для определения профилей гидрофобности.

Понятие "паратоп" в контексте настоящего описания относится к общей структуре связывающей области, которая определяет связывание с эпитопом. Эта структура влияет на то, связывается ли или не связывается, и каким образом связывающая область может связываться с эпитопом. Паратоп может относиться к антигенному центру антитела, который ответствен за связывание антитела или его фрагмента с антигенной детерминантой. Паратоп относится также к идиотопу антитела и к области гипервариабельного участка (CDR), которая связывается с эпитопом. Паратоп представляет собой область антитела, которая связывается с конформационным эпитопом, содержащим (I) аминокислотные остатки HER3 265-277 и 315 (из домена 2) и (II) аминокислотные остатки HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (из домена 4), которые представлены в SEQ ID NO: 1, или их поднабор. Паратоп представляет собой область антитела, которая содержит последовательности CDR. Паратоп может содержать последовательности, представленные в табл. 1. Паратоп может содержать по меньшей мере один аминокислотный остаток, который связывается со следующими остатками HER3: Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, His315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597. Паратоп может также содержать по меньшей мере один аминокислотный остаток, который связывается со следующими остатками HER3: Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615. Как должно быть очевидно специалисту в данной области паратоп любо-

го антитела или его вариант можно определять методом, изложенным в настоящем описании.

Понятие "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в контексте настоящего описания относится к полипептидам, включая антитела, фрагменты антител, биспецифические антитела и т.д., которые имеют практически идентичную аминокислотную последовательность или которые выведены из одного и того же генетического источника. Это понятие включает также препараты молекул антител одинакового молекулярного состава. Композиция моноклональных антител обладает одинаковой специфичностью связывания и аффинностью в отношении конкретного эпитопа.

Понятие "человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится к антителам, несущим переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки выведены из последовательностей, имеющих человеческое происхождение. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также выведена из таких человеческих последовательностей, например последовательностей человеческой зародышевой линии или мутантных версий последовательностей человеческой зародышевой линии, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, выведенные на основе анализа человеческих каркасных последовательностей, который описан у Knappik и др., *J Mol Biol* 296, 2000, сс. 57-86. Структуры и локализацию переменных доменов иммуноглобулина, например CDR, можно определять с помощью хорошо известных систем нумерации, например системы нумерации Кэбота, системы нумерации Хотиа или комбинации систем Кэбота и Хотиа (см., например, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, изд-во U.S. Department of Health and Human Services, под ред. Kabat и др., 1991; Lazikani и др., *J. Mol. Bio.* 273, 1997, сс. 927-948); Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., NIH Publication № 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, 1991; Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917; Chothia и др., *Nature* 342, 1989, сс. 877-883 и Al-Lazikani и др., *J. Mol. Biol.* 273, 1997, сс. 927-948).

Человеческие антитела могут включать также аминокислотные остатки, которые не кодируются человеческими последовательностями (например, в результате мутаций, интродуцированных путем неспецифического или сайтнаправленного мутагенеза *in vitro*, или соматической мутации *in vivo*, или консервативной замены, осуществленной с целью повышения стабильности или облегчения процесса получения).

Понятие "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, обладающим одинаковой специфичностью связывания, которые имеют переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки выведены из человеческих последовательностей. Человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме человека, например трансгенной мыши, в геноме которой содержится трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Понятие "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например к антителам, выделенным из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным благодаря интродукции генов человеческого иммуноглобулина, или которые получены из гибридом, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, трансформированной с целью экспрессии человеческого антитела, например, с использованием трансфектомы, к антителам, выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и к антителам, полученным, экспрессированным, созданным или выделенным любыми другими путями, которые включают сплайсинг всего гена человеческого иммуноглобулина или его части посредством лигирования с другими последовательностями ДНК. Указанные рекомбинантные человеческие антитела несут переменные области, в которых каркасные и CDR-участки выведены из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Указанные рекомбинантные человеческие антитела можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или, когда для получения человеческих последовательностей Ig используют трансгенных животных, соматическому мутагенезу *in vivo*), и в результате аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены и являются родственными последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не встречаться в естественных условиях в популяции антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

Специфическое связывание между двумя субстанциями означает связывание, характеризующееся значением константы равновесия (K_A) (k_{on}/k_{off}), составляющей по меньшей мере 10²M⁻¹, по меньшей мере 5×10²M⁻¹, по меньшей мере 10³M⁻¹, по меньшей мере 5×10³M⁻¹, по меньшей мере 10⁴M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁴M⁻¹, по меньшей мере 10⁵M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁵M⁻¹, по меньшей мере 10⁶M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁶M⁻¹, по меньшей мере 10⁷M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁷M⁻¹, по меньшей мере 10⁸M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁸M⁻¹, по меньшей мере 10⁹M⁻¹, по меньшей мере 5×10⁹M⁻¹, по меньшей мере 10¹⁰M⁻¹, по меньшей мере 5×10¹⁰M⁻¹, по меньшей мере 10¹¹M⁻¹, по меньшей мере 5×10¹¹M⁻¹, по меньшей мере 10¹²M⁻¹, по меньшей мере 5×10¹²M⁻¹, по меньшей мере 10¹³M⁻¹, по меньшей мере 5×10¹³M⁻¹, по меньшей мере 10¹⁴M⁻¹, по меньшей мере 5×10¹⁴M⁻¹, по меньшей мере 10¹⁵M⁻¹ или по меньшей мере 5×10¹⁵M⁻¹.

Понятие "специфически (или избирательно) связывается" с антителом (например с HER3-

связывающим антителом) относится к реакции связывания, которая позволяет определять присутствие родственного антигена (например, человеческого HER3) в гетерогенной популяции белков и других биологических субстанций. Помимо указанной выше константы равновесия (K_D) связывание антитела, предлагаемого в изобретении, с HER3, как правило, характеризуется также значением константы скорости реакции диссоциации (K_D) (k_{off}/k_{on}), составляющей менее чем $5 \times 10^{-2}M$, менее чем $10^{-2}M$, менее чем $5 \times 10^{-3}M$, менее чем $10^{-3}M$, менее чем $5 \times 10^{-4}M$, менее чем $10^{-4}M$, менее чем $5 \times 10^{-5}M$, менее чем $10^{-5}M$, менее чем $5 \times 10^{-6}M$, менее чем $10^{-6}M$, менее чем $5 \times 10^{-7}M$, менее чем $10^{-7}M$, менее чем $5 \times 10^{-8}M$, менее чем $10^{-8}M$, менее чем $5 \times 10^{-9}M$, менее чем $10^{-9}M$, менее чем $5 \times 10^{-10}M$, менее чем $10^{-10}M$, менее чем $5 \times 10^{-11}M$, менее чем $10^{-11}M$, менее чем $5 \times 10^{-12}M$, менее чем $10^{-12}M$, менее чем $5 \times 10^{-13}M$, менее чем $10^{-13}M$, менее чем $5 \times 10^{-14}M$, менее чем $10^{-14}M$, менее чем $5 \times 10^{-15}M$ или менее чем $10^{-15}M$ или менее, и антитело связывается с HER3 с аффинностью, по меньшей мере в 2 раза более высокой, чем аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА)).

Для антитела или его фрагмента характерно значение константы диссоциации (K_D), составляющее менее чем 3000, менее чем 2500, менее чем 2000, менее чем 1500, менее чем 1000, менее чем 750, менее чем 500, менее чем 250, менее чем 200, менее чем 150, менее чем 100, менее чем 75, менее чем 10, менее чем 1пМ при оценке с помощью метода, представленного в настоящем описании, или известного специалисту в данной области метода (например, BiAcogre-анализа, ELISA, FACS, SET) (фирма Biacore International AB, Уппсала, Швеция). Понятие " K_{assoc} " или " K_a " в контексте настоящего описания относится к скорости ассоциации взаимодействия конкретных антитела-антигена, а понятие " K_{dis} " или " K_d " в контексте настоящего описания относится к скорости диссоциации взаимодействия конкретных антитела-антигена. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие " K_D " относится к константе диссоциации, которую получают из соотношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения K_D для антител можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Метод определения значения K_D антитела представляет собой метод, основанный на резонансе поверхностного плазмона, или метод, основанный на применении биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

В контексте настоящего описания понятие "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в одном из антигенсвязывающих центров антитела. В каждом антигенсвязывающем центре варибельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном в многочисленных сайтах; чем сильнее взаимодействия, тем больше аффинность.

В контексте настоящего описания понятие "авидность" относится к информативному критерию общей стабильности или силе комплекса антитело-антиген. Она контролируется тремя основными факторами: аффинностью связывания антитела с эпитопом; валентностью, как антигена, так и антитела; и структурной организацией взаимодействующих участков. Эти три фактора определяют в конечном итоге специфичность антитела, то есть вероятность того, что конкретное антитело будет связываться с точным антигенным эпитопом.

В контексте настоящего описания понятие "валентность" относится к количеству потенциальных связывающих мишень сайтов в полипептиде. Каждый связывающий мишень сайт специфически связывается с одной молекулой-мишенью или специфическим сайтом (т.е. эпитопом) на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного связывающего мишень сайта, то каждый связывающий мишень сайт может специфически связываться с одной и той же молекулой или различными молекулами (например, может связываться с различными молекулами, например, с различными антигенами или различными эпитопами на одной и той же молекуле).

В контексте настоящего описания понятие "антагонистическое антитело" относится к антителу, которое связывается с HER3 и нейтрализует биологическую активность HER3, связанную с передачей сигнала, например уменьшает, снижает и/или ингибирует индуцируемую HER3 сигнальную активность, например, по данным анализа фосфо-HER3 или фосфо-Акт. Примеры анализов описаны более подробно ниже в разделе "Примеры". Таким образом, подразумевается, что понятие "ингибирование" антителом одного или нескольких указанных функциональных свойств HER3 (например, биохимической, иммунохимической, клеточной, физиологической или другого вида биологической активности или т.п.), которое определяют на основе методологий, известных в данной области и представленных в настоящем описании, относится к статистически значимому снижению конкретной активности относительно активности, обнаруженной в отсутствие антитела (или, например, в присутствии контрольного антитела неродственной специфичности). Действие антитела, которое ингибирует активность HER3, заключается в статистически значимом снижении оцениваемого параметра по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 50%, 80% или 90%, антитело может ингибировать более чем на 95%, 98% или 99% функциональную активность HER3, оцениваемую по снижению уровня фосфорилирования клеточного HER3.

Понятие "выделенное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, которое практически свободно от других антител с другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с HER3, практически свободно от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от HER3). Однако выделенное антитело, которое специ-

фически связывается с HER3, может давать перекрестную реакцию с другими антигенами. Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Понятие "консервативно модифицированный вариант" относится как к аминокислотным, так и к нуклеотидным последовательностям. Касательно конкретных нуклеотидных последовательностей понятие "консервативно модифицированные варианты" относится к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или практически идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к практически идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой конкретный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин кодируется кодоном, кодон можно заменять на любые соответствующие известные кодоны без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариантов. В контексте настоящего описания подразумевается, что каждая нуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид, включает также все возможные молчащие варианты нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что каждый кодон нуклеиновой кислоты (за исключением AUG, который, как правило, является единственным кодоном метионина, и TGG, который, как правило, является единственным кодоном триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, подразумевается, что каждая описанная последовательность включает все молчащие варианты нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Касательно полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают индивидуальные замены, делеции или добавления в полипептидную последовательность, которые приводят к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Перечень консервативных замен, обеспечивающих получение функционально сходных аминокислот, хорошо известен в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнительными и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели, предлагаемые в изобретении. Каждая из указанных ниже 8 групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)). Понятие "консервативные модификации последовательностей" применяют для обозначения аминокислотных модификаций, которые не существенно влияют или изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Понятия "перекрестно конкурирует" или "перекрестная конкуренция" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения способности антитела или другого связывающего агента оказывать интерферирующее воздействие на связывание других антител или связывающих агентов с HER3 при оценке с помощью стандартного анализа конкурентного связывания.

Способность или степень, с которой антитело или другой связывающий агент может оказывать интерферирующее воздействие на связывание другого антитела или связывающей молекулы с HER3, и, следовательно, могут ли они рассматриваться как перекрестно конкурирующие, можно определять с помощью стандартных анализов конкурентного связывания. В одном из приемлемых анализов применяют Biacore-технологии (например, с использованием устройства Biacore 3000 (фирма Biacore, Уппсала, Швеция)), с помощью которой можно определять степень взаимодействий с использованием метода на основе резонанса поверхностного плазмона. Другим анализом, который можно применять для оценки перекрестной конкуренции, является подход на основе ELISA.

В контексте настоящего описания понятие "оптимизированная" означает, что нуклеотидная последовательность изменена с позиций кодирования аминокислотной последовательности с помощью кодонов, предпочтительных для продуктивной клетки или организма, как правило, эукариотической клетки, например клетки *Pichia*, клетки *Trichoderma*, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность создают так, чтобы она полностью или максимально возможно сохраняла способность кодировать аминокислотную последовательность, которая кодируется первоначальной исходной нуклеотидной последовательностью, которую называют также "родительской" последовательностью.

Стандартные анализы, применяемые для оценки способности антител связываться с HER3 различных видов, известны в данной области и они включают, например, ELISA, вестерн-блоттинг и РИА. Пригодные анализы описаны подробно в разделе "Примеры". Кинетические характеристики связывания (например, аффинность связывания) антител, можно оценивать также с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как Biacore-анализ, или FACS-анализ для оценки аффинности (анализ Скэтчарда). Анализы оценки воздействия антител на функциональные свойства HER3 (например, анализы связывания рецептора, модуляция пути Her) дополнительно более подробно описаны в разделе "Примеры".

Понятия "идентичность в процентах" или "процент идентичности" в отношении двух или большего количества нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "практически идентичными", если две последовательности имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (т.е. идентичность на уровне 60%, необязательно идентичность на уровне 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% в определенной области или, если она не указана конкретно, в полной последовательности) при сопоставлении и выравнивании с целью выявления максимального соответствия в окне сравнения или в предназначенной для этого области, что устанавливается с использованием одного из перечисленных ниже алгоритмов сравнения или путем сравнения вручную и визуального анализа. Необязательно идентичность имеет место в области длиной примерно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот) или более предпочтительно в области длиной по меньшей мере от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность представляет собой последовательность, с которой проводят сравнение (референс-последовательность) тестируемых последовательностей. При использовании алгоритма сравнения последовательностей данные о тестируемой последовательности и референс-последовательности вводят в компьютер, при необходимости задают координаты подпоследовательности и параметры алгоритма, используемого в программе сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы, задаваемые по умолчанию, или можно создавать альтернативные параметры. После этого с помощью алгоритма сравнения последовательностей рассчитывают с использованием заданных параметров программы процент идентичности для тестируемых последовательностей и референс-последовательности.

В контексте настоящего описания понятие "окно сравнения" относится к фрагменту, содержащему любое количество следующих непрерывно друг за другом положений, выбранных из группы, содержащей от 20 до 600, предпочтительно от примерно 50 до примерно 200, более предпочтительно от примерно 100 до примерно 150 положений, в которых можно сравнивать последовательность с референс-последовательностью, имеющей такое же количество непрерывных положений, после оптимального выравнивания двух последовательностей. Методы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей, пригодные для сравнения, хорошо известны в данной области. Оптимальный сравнительный анализ последовательностей можно осуществлять, например, с использованием алгоритма на основе метода локальной гомологии, разработанного Smith и Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 1970, с. 482, алгоритма сравнительного анализа гомологии, разработанного Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 1970, с. 443, метода поиска сходства, разработанного Pearson и Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85, 1988, с. 2444, с использованием компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, входящих в пакет программ фирмы Wisconsin Genetics, фирма Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США) или путем сравнения вручную и визуального анализа (см., например, Brent и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

Двумя примерами алгоритмов, которые можно применять для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, могут служить алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные у Altschul и др., *Nuc. Acid Res.* 25, 1977, сс. 3389-3402 и у Altschul и др., *J. Mol. Biol.* 215, 1990, сс. 403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов с помощью BLAST может быть предоставлено Национальным центром биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). Согласно этому алгоритму сначала осуществляют выявление пар последовательностей с высокими баллами (HSP) путем идентификации коротких "слов" длины W в рассматриваемой последовательности, которые или совпадают, или удовлетворяют определенной положительной пороговой оценке (баллу) T при сравнении со "словом" такой же длины в последовательности из базы данных. T называется пороговой оценкой (баллом) близкого "слова" (Altschul и др., выше). Эти исходные выборки близкого "слова" используются в качестве "затравки" для инициации поиска, предназначенного для нахождения включающих их более длинных HSP. Затем выборки "слова" удлиняются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока происходит увеличение кумулятивного (накопительного) балла при сравнительном анализе. Кумулятивные баллы для нуклеотидных последовательностей вычисляют с использованием параметров M (призовой балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для вычисления кумулятивного балла используют матрицу баллов. Удлинение выборки "слова" в каждом направлении прекращается в том случае, если кумулятивный балл при сравнительном анализе снижается на величину X от своего максимального достигнутого значения; если кумулятивный балл снижается до нуля или ниже из-за накопления одного или нескольких отрицательных баллов при сравнительном анализе остатков; или если достигается конец какой-либо последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость сравнительного анализа. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве задаваемых по умолчанию параметров используются длина "слова" (W), равная 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$, при этом проводится сравнение обеих цепочек. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP используются в качестве задаваемых по умолчанию параметров длина "слова" (W), равная 3,

ожидание (E), равное 10, и используется матрица баллов BLOSUM62 (см. Henikoff и Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1989, с. 10915) параметр выравнивания (B), равный 50, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4, при этом проводится сравнение обеих цепочек.

С помощью алгоритма BLAST проводят также статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877). Одним из критериев степени сходства, который позволяет получать алгоритм BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая дает оценку вероятности, с которой может произойти случайным образом совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, считается, что тестируемая нуклеотидная последовательность является сходной с референс-последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеотидной последовательности с нуклеотидной референс-последовательностью меньше приблизительно 0,2, более предпочтительно меньше приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше приблизительно 0,001.

Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять также с помощью алгоритма, разработанного E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4, 1988, сс. 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы взвешенных остатков RAM120, штрафа за длину брешы 12 и штрафа за брешь 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48, 1970, сс. 444-453), который включен в программу GAP, входящую в пакет программ GCG (которая доступна на сайте <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы RAM250 и веса брешы 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Кроме определения указанного выше процента идентичности последовательностей другим показателем того, что две нуклеотидные последовательности или два полипептида являются практически идентичными, является тот факт, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реактивностью с антителами, образовавшимися против второго полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как будет описано ниже. Так, полипептид, как правило, является практически идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две нуклеотидные последовательности являются практически идентичными, является тот факт, что две молекулы или их комплементы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, что будет описано ниже. И еще одним показателем того, что две нуклеотидные последовательности являются практически идентичными, является тот факт, что для амплификации последовательностей можно использовать одни и те же праймеры.

Понятие "нуклеиновая кислота" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо с понятием "полинуклеотид", и оно относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в их одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Под это понятие подпадают нуклеиновые кислоты, которые содержат известные нуклеотидные аналоги или модифицированные карбасные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в естественных условиях и не встречающимися в естественных условиях, которые обладают такой же способностью к связыванию, что и нуклеиновая кислота, с которой проводится сравнение (нуклеиновая референс-кислота), и метаболизируются аналогично референс-нуклеотидам. Примерами таких аналогов являются (но, не ограничиваясь только ими) фосфоротиоаты, фосфоамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК).

Если не указано иное, то подразумевается, что конкретная нуклеотидная последовательность включает также ее консервативно модифицированные варианты (например, замены кодонов в рамках вырожденности генетического кода) и комплементарные последовательности, а также специально указанную последовательность. Так, как это будет описано ниже, замены вырожденных кодонов можно осуществлять, создавая последовательности, в которых третье положение одного или нескольких (или всех) кодонов заменено смешанным основанием и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer и др., Nucleic Acid Res. 19, 1991, с. 5081; Ohtsuka и др., J. Biol. Chem. 260, 1985, сс. 2605-2608; и Cassol и др., 1992; Rossolini и др., Mol. Cell. Probes 8, 1994, сс. 91-98).

Понятие "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или большим количеством сегментов полинуклеотида (например, ДНК). Как правило, оно относится к функциональной взаимосвязи транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они обладают цис-активностью. Однако для некоторых транскрипционных регуляторных последовательностей, таких как энхансеры, не является обязательным, чтобы они были физически смежными с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают, или были локализованы в непосредственной близости от них.

Понятия "полипептид" и "белок" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков. Понятие применимо к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный полученный химическим путем миметик соответствующей встречающейся в естественных условиях аминокислоты, а также к встречающимся в естественных условиях аминокислотным полимерам и не встречающимся в естественных условиях аминокислотным полимерам. Если специально не указано иное, то подразумевается, что конкретная полипептидная последовательность включает ее консервативно модифицированные варианты.

Понятие "индивидуум" относится к человеку и животным кроме человека. К животным кроме человека относятся все позвоночные животные, например млекопитающие и животные, не относящиеся к млекопитающим, в том числе приматы кроме человека, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Если специально не указано иное, в контексте настоящего описания понятие "пациент" и "индивидуум" применяют взаимозаменяемо.

Понятие "противораковое средство" означает любое средство, которое можно применять для лечения связанного с клеточной пролиферацией нарушения, такого как рак, в том числе цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и средства для лучевой терапии, противораковые средства направленного действия и иммунотерапевтические средства.

Понятие "опухоль" относится к росту и пролиферации неопластических клеток, злокачественному или доброкачественному, и ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

Понятие "противоопухолевая активность" означает снижение степени пролиферации, жизнеспособности или метастатической активности опухолевых клеток. Возможным путем демонстрации противоопухолевой активности является уменьшение скорости роста аномальных клеток, которое усиливается в процессе терапии, или стабильность или снижение размера опухоли. Указанную активность можно оценивать с помощью приемлемых для анализа *in vitro* или *in vivo* моделей опухолей, включая (но, не ограничиваясь только ими) модели на основе ксенотрансплантатов, модели на основе аллотрансплантатов, моделей на основе MMTV (вирус опухоли молочных желез мышей) и других моделей, которые применяют в данной области для изучения противоопухолевой активности.

Понятие "злокачественное заболевание" относится к недоброкачественной опухоли или раку. В контексте настоящего описания понятие "рак" включает злокачественное заболевание, отличающееся нерегулируемым или неконтролируемым ростом клеток. Примерами рака являются: карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы. Понятие "рак" относится к первичным злокачественным опухолям (например, к тем клеткам, которых не мигрировали в области организма пациента, отличные от области локализации исходной опухоли) и вторичным злокачественным опухолям (например, возникающим в результате метастазов, миграции опухолевых клеток во вторичные области, отличающиеся от области локализации исходной опухоли).

Различные объекты изобретения описаны более подробно в приведенных ниже разделах и подразделах.

Структура и механизм активации HER-рецепторов

Все четыре HER-рецептора имеют внеклеточный лигандсвязывающий домен, один трансмембранный домен и цитоплазматический, содержащий тирозинкиназу домен. Внутриклеточный тирозинкиназный домен HER-рецепторов является высококонсервативным, хотя в киназном домене HER3 присутствуют замены имеющих критическое значение аминокислот и поэтому отсутствует киназная активность (Guo и др., PNAS 91, 1994, сс. 8132-8136). Индуцируемая лигандом димеризация HER-рецепторов приводит к активации киназы, фосфорилированию рецептора на остатках тирозина в С-концевой области, с последующим рекрутментом и активацией эффекторов внутриклеточной передачи сигналов (Yarden и Sliwkowski, Nature Rev 2, 2001, сс. 127-137; Jorissen и др., Exp Cell Res 284, 2003, сс. 31-53).

Изучение кристаллических структур внеклеточных доменов HER-рецепторов позволяет в некоторой степени пролить свет на процессы индуцируемой лигандом активации рецептора (Schlessinger, Cell 110, 2002, сс. 669-672). Внеклеточный домен каждого HER-рецептора состоит из четырех субдоменов: субдомен I и III совместно участвуют в образовании лигандсвязывающего сайта, а субдомен II (и возможно также субдомен IV) принимает участие в димеризации рецептора через непосредственные взаимодействия типа рецептор-рецептор. В структурах связанного с лигандом HER1 β -шпилька (обозначение петли димеризации) в субдомене II взаимодействует с петлей димеризации рецептора-партнера, опосредуя димеризацию рецептора (Garrett и др., Cell 110, 2002, сс. 763-773; Ogiso и др., Cell 110, 2002, сс. 775-787). В противоположность этому в структурах неактивных HER1, HER3 и HER4 петля димеризации участвует во внутримолекулярных взаимодействиях с субдоменом IV, что препятствует димеризации рецептора в отсутствие лиганда (Cho и Leahy, Science 297, 2002, сс. 1330-1333; Ferguson и др., Mol Cell 12, 2003, сс. 541-552; Wouyan и др., PNAS 102, 2005, сс.15024-15029). Структура HER2 является уникальной среди HER-рецепторов. В отсутствие лиганда HER2 имеет конформацию, напоминающую активированное лигандом состояние HER1 с выступающей петлей димеризации, которая доступна для взаимодействия с другими HER-рецепторами (Cho и др., Nature 421, 2003, сс. 756-760; Garrett и др., Mol Cell 11, 2003, сс. 495-505). Это может являться объяснением повышенной способности HER2 к гетеродимеризации.

Хотя кристаллические структуры HER-рецептора представляют собой модель гомо- и гетеродимеризации HER-рецептора, остаются не полностью изученными причина превалирования гомо- и гетеродимеров некоторых HER по сравнению с другими (Franklin и др., *Cancer Cell* 5, 2004, сс. 317-328), а также конформационная роль каждого домена в димеризации и самоингибировании рецептора (Burgess и др., *Mol Cell* 12, 2003, сс. 541-552; Mattoon и др., *PNAS* 101, 2004, сс. 923-928). Как будет описано ниже, изучение кристаллической структуры HER3 в рентгеновских лучах позволяет получать более точные данные.

Структура HER3 и конформационные эпитопы

В настоящем изобретении описан конформационный эпитоп, с которым связываются антигенсвязывающие белки, например, антитела к HER3. Впервые определена трехмерная структура укороченной формы (остатки 20-640) внеклеточного домена HER3 в комплексе с антителом. Структуры комплексов HER3-Fab MOR09823 и HER3-MOR09825 выявлены с разрешением 3,2Å и 3,4Å соответственно, и они показаны на фиг. 5А. В настоящем описании впервые описаны также антитело или его фрагмент, которое/который связывается с HER3 в неактивном состоянии и стабилизирует рецептор в неактивном состоянии. Антитела также обеспечивают конкурентное связывание лиганда HER3, такого как нейрегулин, с HER3-рецептором.

Не вдаваясь в какую-либо теорию, можно предположить, что одной из возможных моделей механизма действия является то, что HER3 находится в неактивном (закрытом, "скованном") или активном (открытом) состоянии. Связывание с лигандом индуцирует конформационное изменение, в результате чего HER3 находится в активном (открытом) состоянии, в котором он обладает способностью связываться с партнерами, участвующими в образовании гетеродимеров, что приводит к активации передачи сигналов в прямом направлении. Антитела, такие как MOR09823, связываются с HER3 в его неактивном ("скованном") состоянии, но не блокируют сайт связывания лиганда. Антитела, такие как MOR09823, ингибируют HER3, препятствуя индуцированным лигандом структурным перегруппировкам, которые необходимы для перехода HER3 в активную конформацию, препятствуя тем самым трансдукции сигнала. Антитела или их фрагменты могут связываться с HER3 в неактивном ("скованном") состоянии, но не блокируют сайт связывания лиганда. Антитела или их фрагменты могут ингибировать HER3 путем предупреждения индуцированных лигандом структурных перегруппировок, необходимых для перехода HER3 в активную конформацию, препятствуя тем самым трансдукции сигнала. Антитело или его фрагмент могут стабилизировать HER3-рецептор в неактивном состоянии или конформации (т.е. непосредственно поддерживать, закрывать, "сковывать", удерживать, преимущественно связывать или "обладать предрасположенностью к нему"). Неактивный HER3-рецептор может обладать чувствительностью к предпочтительной интернализации или расщеплению, что приводит к снижению количества расположенных на клеточной поверхности HER3-рецепторов. Кристаллы HER3 можно получать путем осуществления экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей HER3 или его вариант, в приемлемой клетке-хозяине и последующей кристаллизации очищенного(ых) белка(ов) в присутствии соответствующего Fab, мишенью которого является HER3. Предпочтительно полипептид HER3 содержит внеклеточный домен (аминокислоты 20-640 человеческого полипептида или его укороченную версию, которая предпочтительно содержит аминокислоты 20-640), но у него отсутствуют трансмембранный и внутриклеточные домены.

Полипептиды HER3 можно получать также в виде слитых белков, например, для экстракции и очистки. Примеры белков, которые являются партнерами по слиянию, включают глутатион-S-трансферазу (GST), гистидин (HIS), гексагистидин (6HIS), GAL4 (ДНК-связывающие и/или активирующие транскрипцию домены) и бета-галактозидазу. Может оказаться целесообразным также включать сайт протеолитического расщепления между белком-партнером по слиянию и представляющей интерес белковой последовательностью, что позволяет удалять соответствующие последовательности из слитого белка.

После экспрессии белки можно очищать и/или концентрировать, например, с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом, ионообменной хроматографии и/или гель-фильтрации.

Белок(и) можно кристаллизовать с помощью методов, представленных в настоящем описании. Как правило, в процессе кристаллизации каплю, содержащую раствор белка, смешивают с буфером для кристаллизации и дают уравновеситься в запечатанном контейнере. Для достижения равновесия можно применять известные методы, такие как метод "висящей капли" или "сидящей капли". В этих методах каплю подвешивают над или "сажают" рядом с резервуаром, содержащим намного больший объем буфера для кристаллизации и достигают равновесного состояния в результате диффузии паров. В альтернативном варианте для достижения равновесного состояния можно применять другие методы, например, с использованием масла, осуществляя диффузию через полупроницаемую мембрану или через свободную поверхность раздела (см., например, Chauen и др., *Nature Methods* 5, 2008, сс. 147-153).

После получения кристаллов можно определять их структуру с помощью известных методов дифракции рентгеновских лучей. В многочисленных методиках можно применять химически модифицированные кристаллы, например модифицированные путем дериватизации тяжелым атомом до получения близких фаз. На практике кристалл замачивают в растворе, содержащем соли атомов тяжелых металлов или металлоорганические соединения, например хлорид свинца, тиомалат золота, тимеросал или уранил-

ацетат, которые могут диффундировать через кристалл и связываться с поверхностью белка. Затем локализацию(и) связанного(ых) атома(ов) тяжелого металла можно определять с помощью анализа дифракции рентгеновских лучей на замоченном кристалле. На основе полученных картин дифракции монохроматического пучка рентгеновских лучей (центры рассеяния) на кристалле можно с помощью математических уравнений получать математические координаты. Данные о дифракции применяют для расчета карты электронной плотности повторяющейся единицы в структуре кристалла. Другой метод получения информации о фазах основан на применении техники, известной как молекулярная замена. В этом методе применяют алгоритмы поворота и переноса для поиска модели, выведенной из родственной структуры, что позволяет получить приблизительную ориентацию представляющего интерес белка (см., Rossmann, *Acta Crystals A* 46, 1990, сс. 73-82). Карты электронной плотности используют для определения положений индивидуальных атомов в элементарной ячейке кристалла (Blundel и др., *Protein Crystallography*, изд-во Academic Press, 1976).

В настоящем описании впервые представлена трехмерная структура HER3 и Fab-фрагмента антитела к HER3. Приблизительными границами доменов внеклеточного домена HER3 являются следующие: домен 1: аминокислоты 20-207; домен 2: аминокислоты 208-328; домен 3: аминокислоты 329-498 и домен 4: аминокислоты 499-642. Трехмерная структура HER3 и антитела позволяет идентифицировать также сайты связывания-мишени для потенциальных модуляторов HER3. Предпочтительными сайтами связывания-мишенями являются сайты, участвующие в активации HER3. Сайт связывания-мишень локализован в домене 2 и домене 4 HER3. Таким образом, антитело или его фрагмент, которое/который связывается либо с доменом 2, либо с доменом 4 и предпочтительно с обоими доменами, может модулировать активацию HER3, либо препятствуя диссоциации доменов друг от друга, либо модифицируя относительные положения доменов. Таким образом, связывание антитела или его фрагмента с аминокислотными остатками в домене 2 или домене 4 может приводить к тому, что белок принимает конформацию, которая препятствует активации. В настоящем описании впервые также представлено антитело или его фрагмент, которое/который может одновременно связываться с лигандом HER3, таким как нейрегулин.

Антитело или его фрагмент может распознавать специфическое конформационное состояние HER3, в результате антитело или его фрагмент препятствует взаимодействию HER3 с корецептором (включая (но, не ограничиваясь только ими) HER1, HER2 и HER4). Они могут препятствовать взаимодействию HER3 с корецептором путем стабилизации HER3-рецептора в неактивном или закрытом состоянии. Антитело или его фрагмент может стабилизировать HER3-рецептор путем связывания с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 HER3. В указанном неактивном состоянии петля димеризации, локализованная в домене 2, не выставляется (экспонируется) и следовательно является недоступной для димеризации с другими корецепторами (включая (но, не ограничиваясь только ими) HER1, HER2 и HER4). Антитело или его фрагмент может связываться с человеческим белком HER3, который несет конформационный эпитоп, содержащий (I) аминокислотные остатки HER3 265-277 и 315 (из домена 2) и (II) аминокислотные остатки HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (из домена 4), которые представлены в SEQ ID NO: 1, или их поднабор. Антитело или его фрагмент может связываться с аминокислотами, которые входят в фрагмент, включающий аминокислотные остатки 265-277 и 315 (из домена 2), или перекрывающимися аминокислотными остатками и (II) аминокислотными остатками HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (из домена 4), которые представлены в SEQ ID NO: 1. Антитело или его фрагмент может связываться с аминокислотами, которые входят в фрагмент, включающий (и/или аминокислотными последовательностями, которые состоят из) аминокислоты 265-277 и 315 (из домена 2), и (II) аминокислотными остатками HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (из домена 4), которые представлены в SEQ ID NO: 1, или их под набором. Антитело или его фрагмент может связываться с конформационным эпитопом таким образом, что ограничивает подвижность домена 2 и домена 4, стабилизируя их в неактивной или закрытой конформации. Невозможность формирования активной конформации приводит к невозможности активировать трансдукцию сигнала. Антитело или его фрагмент может связываться с конформационным эпитопом таким образом, что закрывает петлю димеризации в домене 2, тем самым делая ее недоступной для взаимодействия типа рецептор-рецептор. Невозможность формирования гомо- или гетеродимеров приводит к невозможности активировать трансдукцию сигнала.

Антитело или его фрагмент также может связываться с конформационным эпитопом HER-рецептора, такого как HER3-рецептор. Антитело или его фрагмент способен стабилизировать HER3-рецептор в неактивном состоянии. Антитело или его фрагмент может связываться с HER3-рецептором в активном состоянии и превращает его в неактивное состояние. Таким образом, антитело или его фрагмент может связываться с HER3 в активном или неактивном состоянии и превращает активное состояние HER3 в неактивное состояние, что приводит к невозможности активировать путь трансдукции сигнала.

Антитело или его фрагмент может связываться с конформационным эпитопом HER-рецептора, такого как HER3-рецептор, при этом связывание антитела или его фрагмента стабилизирует HER3-рецептор в неактивном состоянии, в результате чего HER3-рецептор не может димеризоваться с корецептором с образованием комплекса рецептор-рецептор. Невозможность образовывать комплекс рецептор-рецептор препятствует активации как зависимой от лиганда, так и независимой от лиганда трансдукции сигнала.

Антитело или его фрагмент может связываться с конформационным эпитопом HER-рецептора, такого как HER3-рецептор, при этом связывание антитела или его фрагмента с HER3-рецептором позволяет происходить димеризации с корецептором с образованием неактивного комплекса рецептор-рецептор. Формирование неактивного комплекса рецептор-рецептор препятствует активации независимой от лиганда трансдукции сигнала. HER3 может находиться в неактивном состоянии, однако сверхэкспрессия HER2 позволяет образовываться комплексу HER2-HER3, при этом эти образовавшиеся комплексы являются неактивными и предупреждают активацию независимой от лиганда трансдукции сигнала.

Указанная структура также позволяет идентифицировать специфические коровые аминокислотные остатки HER3 в области контакта, в которой происходит взаимодействие антитела или его фрагмента (например, MOR09823) и HER3. Установлено, что эти остатки находятся в пределах 5Å от VH-цепи белка MOR09823. Коровыми остатками являются следующие остатки: Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597.

Указанные структуры можно использовать также для идентификации пограничных аминокислотных остатков HER3 области контакта, в которой происходит взаимодействие с антителом или его фрагментом (например, MOR09823). Эти остатки могут представлять собой остатки HER3, расположенные на расстоянии 5-8Å от VH-цепи белка MOR09823. Пограничными являются следующие остатки: Pro262, Val264, Tyr265, Phe270, Leu272, Thr278, Lys314, Gly316, Glu321, Asn566, Ser568, Gly569, Ser570, Thr572, Arg580, Asp581, Gly582, Gly595, Gly598, Ile600.

Указанная структура позволяет также идентифицировать специфические коровые аминокислотные остатки HER3 области контакта, в которой происходит взаимодействие антитела или его фрагмента (например, MOR09823) с HER3. Установлено, что эти остатки находятся в пределах 5Å от VL-цепи белка MOR09823. Коровыми остатками являются следующие остатки: Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615.

Указанные структуры можно применять также для идентификации пограничных аминокислотных остатков HER3 области контакта, в которой происходит взаимодействие с антителом или его фрагментом (например, MOR09823). Эти остатки могут представлять собой остатки HER3, расположенные на расстоянии 5-8Å от VL-цепи белка MOR09823. Пограничными являются следующие остатки: Asn266, Thr269, Asp571, Arg580, Asp581, His584, Pro590, Ala596, Pro599, Tyr601, Tyr603, Asp605, Gln607, Cys610, Asn616, Cys617, Cys621, Gly623, Pro624.

Как можно видеть из табл. 11 и 12 (MOR09823) и табл. 13 и 14 (MOR09825) соответственно, тяжелая цепь участвует главным образом в связывании антигенсвязывающего белка с аминокислотными остатками в домене 2 эпитопа и в меньшей степени участвует во взаимодействиях с аминокислотными остатками в домене 4, в то время как легкая цепь главным образом участвует в связывании с аминокислотными остатками в домене 4 эпитопа и в меньшей степени участвует во взаимодействиях с аминокислотными остатками в домене 2.

Специалист в данной области на основе настоящего описания может предсказать, какие остатки и области антигенсвязывающих белков можно варьировать без чрезмерного воздействия на способность антигенсвязывающего белка связываться с HER3.

В качестве коровых аминокислот области контакта, в которой происходит взаимодействие, рассматриваются все аминокислотные остатки, по меньшей мере один атом которых находится на расстоянии, меньшем или равным 5Å, от белка-партнера (по связыванию) HER3. 5Å выбрано в качестве предельного расстояния в коровой области, позволяющего атомам находиться в радиусе действия сил Ван-дер-Ваальса, а также возможной опосредуемой водой водородной связи. В качестве пограничных аминокислот области контакта, в которой происходит взаимодействие, рассматриваются все аминокислотные остатки, по меньшей мере один атом которых находится на расстоянии, меньшем или равным 8Å, от белка-партнера (по связыванию) HER3, но не входящие в группу коровых участвующих во взаимодействии остатков.

Любой антигенсвязывающий белок, который связывается, перекрывает или препятствует взаимодействию MOR09823 с любым из вышеуказанных остатков, можно применять для связывания или нейтрализации HER3. Антитела или их фрагменты могут связываться или взаимодействовать по меньшей мере с одним из следующих остатков HER3 (SEQ ID NO: 1): Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597. Антитела или их фрагменты могут связываться или взаимодействовать по меньшей мере с одним из следующих остатков HER3 (SEQ ID NO: 1): Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615. Антитела или их фрагменты могут связываться или взаимодействовать по меньшей мере с одним из следующих остатков HER3 (SEQ ID NO: 1): Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597, Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613,

His614, Glu615. Антитела или их фрагменты могут связываться или взаимодействовать со всеми следующими остатками HER3 (SEQ ID NO: 1): Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597, Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615. Антитела или их фрагменты могут находиться на расстоянии в пределах 5 Å от одного или нескольких вышеуказанных остатков. Антитела или их фрагменты могут находиться на расстоянии в пределах 5-8 Å от одного или нескольких вышеуказанных остатков. Антитело или его фрагмент могут взаимодействовать, блокировать или находиться на расстоянии в пределах 8 Å от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 вышеуказанных остатков.

Наличие сведений о 3D-структурах HER3 и комплекса HER3:MOR09823, например, является основой для более детального изучения других антител к HER3. На основе 3D-структуры HER3 можно картировать эпитопы для моноклональных антител и делать заключение об их механизме действия, поскольку некоторые из них ингибируют, некоторые из них стимулируют, а другие не оказывают воздействия на клеточный рост. Конформационный эпитоп для MOR09823 локализован в доменах 2 и 4 HER3. Наличие сведений о 3D-структурах этого рецептора должно облегчать определение точного механизма действия указанных обладающих ингибирующим действием агентов и создавать новые подходы для воздействия на функцию HER3-рецептора. Антитела, предлагаемые в изобретении, связываются с тем же конформационным эпитопом, что и MOR09823.

Наиболее приемлемым является конформационный эпитоп, с которым связываются любые антитела, перечисленные в табл. 1. Конформационный эпитоп HER3 можно применять для выделения антител или их фрагментов, которые связываются с HER3. Конформационный эпитоп HER3 можно применять для создания антител или их фрагментов, которые связываются с HER3. Конформационный эпитоп HER3 можно применять в качестве иммуногена для создания антител или их фрагментов, которые связываются с конформационным эпитопом HER3. Конформационный эпитоп HER3 можно вводить животному и затем получать из организма животного антитела, которые связываются с HER3.

Домен(ы)/область(и), содержащий(ие) остатки, которые находятся в контакте с антителом или "захвачены" антителом, можно идентифицировать путем осуществления мутации специфических остатков HER3 (например, в антигене дикого типа) и определения того, может ли антитело или его фрагмент связываться с мутантом или вариантом белка HER3, или оценивая изменения аффинности по сравнению с вариантом дикого типа. Путем создания ряда индивидуальных мутаций, таких как мутации, которые могут влиять на связывание между антителом и антигеном, можно идентифицировать остатки, которые принимают непосредственное участие в связывании или которые находятся в достаточной тесной близости к антителу. На основе сведений об этих аминокислотах можно выявлять домен(ы) или область(и) антигена (HER3), которые содержат остатки, имеющие контакт с антителом или перекрывающиеся антителом. Мутагенез на основе известных технологий, таких как сканированием аланином, может способствовать выявлению функционально приемлемых эпитопов. Можно применять также мутагенез, основанный на применении протокола сканирования аргинином/глутаминовой кислотой (см., например, Napevicz и др., J. Biol. Chem. 270(37), 1995, сс. 21619-21625 и Zupnick и др., J. Biol. Chem. 281(29), 2006, сс. 20464-20473). Как правило, аминокислоту в полипептиде дикого типа заменяют (как правило, по отдельности) на аргинин и глутаминовую кислоту, поскольку эти аминокислоты являются заряженными и имеют большой объем и поэтому обладают способностью нарушать связывание между антигенсвязывающим белком и антигеном в области антигена, в которую интродуцирована мутация. Остатки аргинина, которые присутствуют в антигене дикого типа, заменяют на глутаминовую кислоту. Можно получать широкое разнообразие индивидуальных мутантов и анализировать обобщенные результаты связывания, определяя, какие остатки влияют на связывание. Можно создавать серии мутантных антигенов HER3, в которых каждый мутантный антиген несет одну мутацию. Можно оценивать связывание каждого мутантного антигена HER3 с различными антителами к HER3 или их фрагментами и сравнивать способность отобранного антитела или его фрагмента связываться с HER3 дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В контексте настоящего описания подразумевается, что изменение (например, уменьшение или увеличение) связывания антитела или его фрагмента с мутантом или вариантом HER3 свидетельствует об изменении аффинности связывания (например, для измерения которой используют известные методы, такие как Вiasогe-анализ или основанный на применении гранул анализ, который описан ниже в разделе "Примеры"), значении EC_{50} и/или изменении (например, снижении) общей силы (способности к) связывания антигенсвязывающего белка (например, оцененной по снижению значения V_{max} на графике зависимости связывания от концентрации антигенсвязывающего белка и концентрации антигена). Существенное изменение связывания свидетельствует о том, что подвергнутый мутации остаток участвует в связывании с антителом или его фрагментом.

Наличие снижения связывания означает, что аффинность связывания, EC_{50} и/или сила (способность) связывания между антителом или его фрагментом и мутантным антигеном HER3 снижена более чем на 10%, более чем на 20%, более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95% относительно связывания антитела или его фрагмента с HER3 дикого типа (на-

пример, SEQ ID NO: 1).

Связывание антитела или его фрагмента с мутантным белком HER3, который имеет одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) мутаций, существенно снижается или возрастает по сравнению с белком HER3 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1).

Касательно последовательности дикого типа, которая представлена в SEQ ID NO: 1, должно быть очевидно, что в аллельных или сплайсинговых вариантах HER3 аминокислоты могут различаться. Под объем изобретения подпадают также антитела или фрагменты, для которых обнаружена существенное изменение связывания (например, пониженное или повышенное связывание) с такими аллельными формами HER3.

Помимо общих структурных аспектов антител на основе структурных подходов можно оценивать более специфические взаимодействия между паратопом и эпитопом. Структура CDR-участков определяет паратоп, посредством которого антитело может связываться с эпитопом. Форму указанного паратопа можно определять различными путями. Можно использовать традиционные основанные на изучении структуры подходы, такие как ЯМР или рентгеновская кристаллография. С помощью таких подходов можно оценивать форму индивидуального паратопа или паратопа, связанного с эпитопом. В альтернативном варианте можно создавать молекулярные модели путем компьютерного моделирования (*in silico*). Структуру можно создавать посредством моделирования по гомологии с помощью поступающего в продажу пакета программ, таких как программа моделирования InsightII фирмы Accelrys (Сан-Диего, шт. Калифорния). В целом, метод состоит в следующем: можно применять последовательность антитела, подлежащего изучению, для поиска в базах данных белков с известными структурами, таких как банк данных белков (Protein Data Bank). После идентификации гомологичных белков с известными структурами эти гомологичные белки применяют в качестве матриц для моделирования. Каждую из возможных матриц можно выравнивать, осуществляя тем самым основанный на структуре сравнительный анализ последовательностей между матрицами. Затем последовательность антитела с неизвестной структурой можно выравнивать с этими матрицами для создания молекулярной модели антитела с неизвестной структурой. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, существует много альтернативных методов создания таких структур *in silico*, можно применять любую из них. Например, можно применять процесс, аналогичный описанному у Hardman и др., в US № 5958708 (публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки), в котором применяют программу QUANTA (фирма Polygen Corp., Уолтхэм, шт. Массачусетс) и программу CHARMM (Brooks и др., J. Сотр. Chem. 4, 1983, с. 187).

Не только форма паратопа важна для решения вопроса о том, будет ли иметь место связывание, и насколько успешно будет связываться возможный паратоп с эпитопом, но также и само взаимодействие между эпитопом и паратопом является источником важной информации при разработке вариантов антител. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, существуют различные пути изучения указанного взаимодействия. Одним из путей является создание структурных моделей, в том числе описанных выше, и последующее применение программы, такой как InsightII (фирма Accelrys, Сан-Диего, шт. Калифорния), которая имеет стыковочный модуль, который, среди прочего, позволяет осуществлять поиск методом Монте Карло в конформационном и ориентационном пространстве между паратопом и его эпитопом. В результате можно определять, где и как эпитоп взаимодействует с паратопом. Для оценки соответствующих взаимодействий можно применять только фрагмент или вариант эпитопа. Для моделирования взаимодействия между паратопом и эпитопом можно применять полный эпитоп.

Путем применения этих смоделированных структур можно предсказывать, какие остатки являются наиболее важным для взаимодействия между эпитопом и паратопом. Так, можно легко определять, какие остатки требуется изменять для изменения характеристик связывания антитела. Например, из стыковочных моделей может быть ясно, что боковые цепи определенных остатков в паратопе могут стерически препятствовать связыванию эпитопа, поэтому замена этих остатков на остатки с меньшими боковыми цепями может оказывать благоприятное действие. Это можно определять различными путями. Например, можно просто визуальное оценивать две модели и определять взаимодействия на основе функциональных групп и их близости. В альтернативном варианте можно осуществлять повторные спаривания эпитопа и паратопа согласно описанному выше методу для получения более предпочтительных с точки зрения энергии взаимодействий. Можно также определять эти взаимодействия для широкого разнообразия вариантов антител для выявления альтернативных путей, посредством которых антитело может связываться с эпитопом. Можно также объединять различные модели для решения вопроса о том, как следует изменять структуру антител для получения антитела с конкретными требуемыми характеристиками.

Указанные выше модели можно тестировать с помощью различных методов. Например, можно определять энергию взаимодействия с помощью описанных выше программ для выявления вариантов для дополнительной оценки. Кроме того, оценивают кулоновские (электростатические) взаимодействия и взаимодействия Ван-дер-Ваальса для определения энергии взаимодействия эпитопа и вариантов паратопа. Кроме того, применяют сайтнаправленный мутагенез для решения вопроса о том, могут ли предсказанные изменения в структуре антитела фактически приводить к требуемым изменениям характеристик связывания. В альтернативном варианте изменения могут затрагивать эпитоп для подтверждения того, что модели являются корректными или для определения общих основ связывания, которые могут иметь

место между паратопом и эпитопом.

Как должно быть очевидно специалисту в данной области, хотя эти модели должны представлять собой руководство, необходимое для создания антител и их вариантов все еще может являться необходимым осуществлять рутинное тестирование моделей *in silico*, вероятно, с помощью опытов *in vitro*. Кроме того, как должно быть очевидно специалисту в данной области, что любая модификация может оказывать также дополнительные побочные действия на активность антитела. Например, хотя некоторые изменения, которые как ожидается, должны приводить к усилению связывания, могут приводить к повышенному связыванию, это может также вызывать другие структурные изменения, которые могут снижать или изменять активность антитела. Решение вопроса о том, имеет ли это место в конкретном случае, является рутинным в данной области, и для этого можно применять различные пути. Например, активность можно оценивать с помощью метода ELISA. В альтернативном варианте образцы можно оценивать с помощью устройства, которое является детектором резонанса поверхностного плазмона.

Антитела к HER3

При создании изобретения неожиданно было установлено, что класс антител к HER3 блокирует как зависимые от лиганда, так и независимые от лиганда пути трансдукции сигнала HER3. Класс антител, которые связываются с конкретным конформационным эпитопом HER3, представлен в табл. 1. Эти антитела ингибируют как зависимую от лиганда, так и независимую от лиганда передачу сигнала HER3. Они также могут связываться с HER3 и не блокируют связывание лиганда HER с лигандсвязывающим сайтом (т.е. и лиганд, и антитело могут связываться с HER3 одновременно).

Антитела, которые специфически связываются с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус), могут содержать VH-область, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, 33, 51, 69, 87, 105, 123, 141, 159, 177, 195, 213, 231, 249, 267, 285, 303, 321, 339, 357 и 375. Антитела, которые специфически связываются с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус), могут содержать VL-область, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, 32, 50, 68, 86, 104, 122, 140, 158, 176, 194, 212, 230, 248, 266, 284, 302, 320, 338, 356 и 374. Антитела, которые специфически связываются с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус), могут содержать CDR VH, который имеет аминокислотную последовательность любого из CDR VH, представленных ниже в табл. 1. В частности, антитела, которые специфически связываются с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус), могут содержать (или в альтернативном варианте состоят из) один, два, три, четыре, пять или большее количество CDR VH, которые имеют аминокислотную последовательность любого из CDR VH, представленных ниже в табл. 1.

Другие антитела включают подвергнутые мутации аминокислоты, но их CDR-участки еще по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 98% идентичны CDR-участкам, которые имеют последовательности, представленные в табл. 1. Они включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в CDR-участках были подвергнуты мутации по сравнению с CDR-участками, последовательности которых представлены в табл. 1, при этом все еще сохраняется их специфичность в отношении исходного эпитопа антитела.

Другие антитела включают подвергнутые мутации аминокислоты, но их каркасные участки еще по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 98% идентичны каркасным участкам, которые имеют последовательности, представленные в табл. 1. Они включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в каркасных участках были подвергнуты мутации по сравнению с каркасными участками, последовательности которых представлены в табл. 1, при этом все еще сохраняется их специфичность в отношении исходного эпитопа антитела. В настоящем изобретении описаны также нуклеотидные последовательности, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфически связываются с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус).

Антитела к HER3 связываются с конформационным эпитопом HER3, который содержит аминокислотные остатки из домена 2 и домена 4 HER3.

Таблица 1. Примеры антител к HER3, предлагаемых в настоящем изобретении

| SEQ ID NO: | Область Ат | |
|-------------------------|------------|-------------------|
| MOR09823 | | |
| SEQ ID NO: 2 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 3 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVGRITYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 4 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 5 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 6 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 7 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |

| | | |
|--------------------------|-----------------------|--|
| SEQ ID NO: 8 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 9 (Хотиа) | HCDR2 | GAVGR |
| SEQ ID NO: 10 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 11 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 12 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: (Хотиа) 13 | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 14 | VL | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIK |
| SEQ ID NO: 15 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGRYYPDVSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGGQTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 16 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCATACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGACCCGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATC CGGCACGTATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTTATTTGCCAGCAGTATTCTTCTTTCTACTACCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATAAA |
| SEQ ID NO: 17 | ДНК VH | CAGGTGCAATTTGGTGGAAAGCGGCGGCTGGTGCACCGGGCGGCGAG CCTGCGTCTGAGCTGCGGCGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTT ACTGGTGTCTTGGTCTGACTTATATCCTGATCTGTAAAGGGTCTGTTT TACCATTTACAGTGAATTCGAAAACACCCCTGATCTGCAATGAACA GCCTGCGTGGGGAAGATACGGCCGTGATATTGCGCGGCTTGGGGTGAT GAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA |
| SEQ ID NO: 18 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIKRTVAAPSVEIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQKWV ДНKLQSGNSQESVTEQDSKDYLSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 19 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGRYYPDVSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGGQTLVTVSSASTKGPSVFLPASPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYR VVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSD GSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK |
| MOR09824 | | |
| SEQ ID NO: 20 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 21 (Кэбот) | HCDR2 | VISAWGHVKYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 22 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 23 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 24 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 25 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 26 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 27 (Хотиа) | HCDR2 | SAWGHV |
| SEQ ID NO: 28 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 29 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 30 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 31 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 32 | VL | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIK |

| | | |
|--------------------------|-----------------------|--|
| SEQ ID NO: 33 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 34 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCAATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTTTACGGCTCTGGATC CGGCACGTGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTTATTTGCCAGCAGTATTCTTCTTTCTACTACCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATTA |
| SEQ ID NO: 35 | ДНК VH | CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGCGCGCCTGGTGCACCCGGCGGCAG CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTT ATTTCTGCTGGGGTCAATGTTAAGTATTATGCTGATCTGTTAAGGGTCG TTTTACCATTTACCGTATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGCGTGCAGGAGATACGGCCGTGATTTATGCGCGCTTGGGGT GATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTC A |
| SEQ ID NO: 36 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTTFGQ GTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNRFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 37 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR09825 | | |
| SEQ ID NO: 38 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 39 (Кэбот) | HCDR2 | AINSQGKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 40 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 41 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 42 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 43 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 44 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 45 (Хотиа) | HCDR2 | NSQGKS |
| SEQ ID NO: 46 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 47 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 48 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 49 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 50 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTTFGQ GTVKVEIK |
| SEQ ID NO: 51 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA INSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 52 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCAATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTTTACGGCTCTGGATC CGGCACGTGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTTATTTGCCAGCAGTATTCTTCTTTCTACTACCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATTA |
| SEQ ID NO: 53 | ДНК VH | CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGCGCGCCTGGTGCACCCGGCGGCAG CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCT ATTAATCTCAGGGTAAGTCTACTTATTTATGCTGATTTGTTAAGGGTCG TTTTACCATTTACCGTATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGCGTGCAGGAGATACGGCCGTGATTTATTTGCGCGCTTGGGGT GATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTC A |

| | | |
|--------------------------|-----------------------|---|
| SEQ ID NO: 54 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 55 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWNSGALTSGVHTEFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT LPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR09974 | | |
| SEQ ID NO: 56 (Кэбор) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 57 (Кэбор) | HCDR2 | VINPSGNFTNYADSVKQ |
| SEQ ID NO: 58 (Кэбор) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 59 (Кэбор) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 60 (Кэбор) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 61 (Кэбор) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 62 (Хогна) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 63 (Хогна) | HCDR2 | NPSGNF |
| SEQ ID NO: 64 (Хогна) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 65 (Хогна) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 66 (Хогна) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 67 (Хогна) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 68 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK |
| SEQ ID NO: 69 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV INPSGNFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 70 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGTGA TCGTGTGACCAATTACCTGACAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTCTTAGCGGCTCTGGATC CGGCACATGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTATTTATGCCAGCAGTATTTCTTTCTTCTACTACCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATTA |
| SEQ ID NO: 71 | ДНК VH | CAGGTGCAATTTGGTGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGAACCGGGCGGCGAG CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTT ATTAATCCTTCTGGTAATTTACTAATTAAGCTGATTTGTTAAGGGTCTG TTTACCATTTACGATGATAATCGAAAAACACCTGTATCTGCAAAATGA ACAGCCTGCGTGGCAGAGTACGGCCGTGATTTATGCGCGCGTGGGCT GATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTC A |
| SEQ ID NO: 72 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 73 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV INPSGNFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWNSGALTSGVHTEFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT LPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10452 | | |
| SEQ ID NO: 74 (Кэбор) | HCDR1 | SYAMS |

| | | |
|---------------------------|--|--|
| SEQ ID NO: 75 (Кэбот) | HCDR2 | NTSPIGYTYYSVKG |
| SEQ ID NO: 76 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 77 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 78 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 79 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 80 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 81 (Хотиа) | HCDR2 | SPIGY |
| SEQ ID NO: 82 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 83 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 84 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 85 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 86 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYQCQQYSSFPTTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 87 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSN TSPIGYTYYSVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICARWGD EGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 88 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCATACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTCTTAGCGGCTCTGGATC CGGCACGTGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTTATTAATGCCAGCAGTATTTCTTTCTACTACTCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATAAA |
| SEQ ID NO: 89 | ДНК VH | CAGGTGCAATGGTGGAAAGCGGCGGCGCTGGTGCACCGGGCGGCAG CCTGCGTCTGAGCTGCGCGCCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAAT ACTTCTCCTATGGTTATACTTATATGCTGGTCTGTAAAGGGTCTGTTT TACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAATGAACA GCCTGCGTGGGAAGATACGGCCGTGATATTTGCGCGCGTGGGGTGGT GAGGGTTTGTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTACCGGTTAGCTCA |
| SEQ ID NO: 90 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYQCQQYSSFPTTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPAKVQWV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEA |
| SEQ ID NO: 91 | Тяжелая цепь (только VH- и CH1-домены) | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSN TSPIGYTYYSVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICARWGD EGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTRKVDKVEPKS |
| MOR10701 | | |
| SEQ ID NO: 92 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 93 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVGRSTYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 94 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 95 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 96 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 97 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 98 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 99 (Хотиа) | HCDR2 | GAVGRS |
| SEQ ID NO: 100 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 101 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|---|
| SEQ ID NO: 102 (Хотна) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 103 (Хотна) | LCDR3 | YSSEPT |
| SEQ ID NO: 104 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIK |
| SEQ ID NO: 105 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 106 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCAGAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGCACCAGGTGGAATCAAG |
| SEQ ID NO: 107 | ДНК VH | GAGGTGCAATTTGCTGAAAGCGGCGGAGGCTGTTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTTGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCTGG ACAGGCGCGTGGGCGAGAAGCACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCAGCCGGGACACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGC GACGAGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 108 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPRAKVAQKVV DHKLSQNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 109 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKIYF PEPVTVSWNSGALTSVHTEFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVFKSCDKHTCPPELLEGGSPVFLPFPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYIT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10702 | | |
| SEQ ID NO: 110 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 111 (Кэбот) | HCDR2 | VISAAGHVKYADSVKG |
| SEQ ID NO: 112 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 113 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 114 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 115 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 116 (Хотна) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 117 (Хотна) | HCDR2 | SAWGHV |
| SEQ ID NO: 118 (Хотна) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 119 (Хотна) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 120 (Хотна) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 121 (Хотна) | LCDR3 | YSSEPT |
| SEQ ID NO: 122 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTVKEIK |
| SEQ ID NO: 123 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV ISAAGHVKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 124 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCAGAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTCCCCACCACCTTCGGCCAG |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| | | GGCACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 125 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCA TGAGCTGGGTCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGGC ATCAGCGCCTGGGGCCACGTGAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCCTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 126 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVTVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 127 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV ISAWGHVYKADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMISSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYD LPPSRERMTRNKQVSLTCLVKGFPYSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 | | |
| SEQ ID NO: 128 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 129 (Кэбот) | HCDR2 | AINSQGKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 130 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 131 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 132 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 133 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 134 (Хогиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 135 (Хогиа) | HCDR2 | NSQGKS |
| SEQ ID NO: 136 (Хогиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 137 (Хогиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 138 (Хогиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 139 (Хогиа) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 140 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK |
| SEQ ID NO: 141 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSS |
| SEQ ID NO: 142 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 143 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCA TGAGCTGGGTCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGGC ATCAACAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCCTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 144 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVTVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 145 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| | | PEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYKSLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 N52S | | |
| SEQ ID NO: 146 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 147 (Кэбот) | HCDR2 | AI <u>S</u> SQ GKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 148 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 149 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 150 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 151 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 152 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 153 (Хотиа) | HCDR2 | <u>S</u> SQ GK S |
| SEQ ID NO: 154 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 155 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 156 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 157 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 158 | VL | DIQMTQSFSSLSASVGDVRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 159 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA <u>I</u> SQ GKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWQQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 160 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCGAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGCACC AAGGTGGAATCAAG |
| SEQ ID NO: 161 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGTGTCCGCC ATCAGCAGCCAGGGCAAGAGCACCCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAAGCTC A |
| SEQ ID NO: 162 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSFSSLSASVGDVRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWVQ DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQV LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 163 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA <u>I</u> SQ GKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWQQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYKSLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 N52G | | |
| SEQ ID NO: 164 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 165 (Кэбот) | HCDR2 | AI <u>S</u> SQ GKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 166 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 167 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|--|
| SEQ ID NO: 168 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 169 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 170 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 171 (Хотиа) | HCDR2 | <u>G</u> SQGKS |
| SEQ ID NO: 172 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 173 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 174 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 175 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 176 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 177 | VH | EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA IGSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 178 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGCCAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGACCAAGGTGGAATCAAG |
| SEQ ID NO: 179 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCC ATCGGCCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCACCATCAGCCGGGACACAGCAAGAACACCTGTACTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 180 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 181 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA IGSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVFKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYIT LPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 N52S S52aN | | |
| SEQ ID NO: 182 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 183 (Кэбот) | HCDR2 | A1 <u>SN</u> QGKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 184 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 185 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 186 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 187 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 188 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 189 (Хотиа) | HCDR2 | <u>SN</u> QGKS |
| SEQ ID NO: 190 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 191 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 192 | LCDR2 | GAS |

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------|--|
| (Хотна) | | |
| SEQ ID NO: 193 (Хотна) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 194 | VL | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK |
| SEQ ID NO: 195 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSYAMSWVRQAPGKGLWVSA I SN QGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSS |
| SEQ ID NO: 196 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGGTCC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCCACTTCGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 197 | ДНК VH | GAGGTGCAATGCTGGAAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCC ATCAGCAACCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACTCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCTCGGCATC A |
| SEQ ID NO: 198 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKV DHLKLSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 199 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSYAMSWVRQAPGKGLWVSA I SN QGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| MOR10703 A50V N52S | | |
| SEQ ID NO: 200 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 201 (Кэбот) | HCDR2 | V ISQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| SEQ ID NO: 202 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 203 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLAW |
| SEQ ID NO: 204 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 205 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPTT |
| SEQ ID NO: 206 (Хотна) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 207 (Хотна) | HCDR2 | S SQGKS |
| SEQ ID NO: 208 (Хотна) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 209 (Хотна) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 210 (Хотна) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 211 (Хотна) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 212 | VL | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK |
| SEQ ID NO: 213 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSYAMSWVRQAPGKGLWVSA I SN QGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTFLVTVSS |
| SEQ ID NO: 214 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGGTCC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCCACTTCGGCCAG |

| | | |
|-------------------------------------|-------------------|---|
| | | GGCACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 215 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCCGCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTCATCAGCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCAGCAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTCAGTCA |
| SEQ ID NO: 216 | Легкая капша-цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 217 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVISQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDGFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPLVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 A50V_N52G | | |
| SEQ ID NO: 218 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 219 (Кэбот) | HCDR2 | <u>V</u> IGSQGKSTYYADSVKGR |
| SEQ ID NO: 220 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 221 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 222 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 223 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 224 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 225 (Хотиа) | HCDR2 | <u>G</u> SQGKS |
| SEQ ID NO: 226 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 227 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 228 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 229 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 230 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK |
| SEQ ID NO: 231 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVISQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDGFDLWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 232 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCAGAGCAGATTCAGCGGCAGCGGTCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 233 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCCGCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTCATCGGCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCAGCAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTCAGTCA |
| SEQ ID NO: 234 | Легкая капша-цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 235 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVISQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDGFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPLVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| | | DEGFDIWGGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYF LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 S52aA | | |
| SEQ ID NO: 236 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 237 (Кэбот) | HCDR2 | AINAQQGKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 238 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 239 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGINSWLA |
| SEQ ID NO: 240 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 241 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 242 (Хотна) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 243 (Хотна) | HCDR2 | NAQQGKS |
| SEQ ID NO: 244 (Хотна) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 245 (Хотна) | LCDR1 | SQGINSW |
| SEQ ID NO: 246 (Хотна) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 247 (Хотна) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 248 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 249 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INAAQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYFCARWG DEGFDIWGGTTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 250 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGCGGTGCCAAGCAGATTCAGCGCCAGCGGCTC CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAG GGCACCAGGTGGAATCAAG |
| SEQ ID NO: 251 | ДНК VH | GAGGTGCAATGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCGCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCC ATCAACGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCGTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 252 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 253 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INAAQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYFCARWG DEGFDIWGGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYF LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK |
| MOR10703 S52aT | | |
| SEQ ID NO: 254 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 255 (Кэбот) | HCDR2 | AINAQQGKSTYYADSVKG |
| SEQ ID NO: 256 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 257 | LCDR1 | RASQGINSWLA |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|---|
| (Кэбот) | | |
| SEQ ID NO: 258 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 259 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 260 (Хогиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 261 (Хогиа) | HCDR2 | NTQGKS |
| SEQ ID NO: 262 (Хогиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 263 (Хогиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 264 (Хогиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 265 (Хогиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 266 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 267 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA IN <u>NT</u> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 268 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCCAGCGGCTC CGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAG GGCACCAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 269 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGCTTTCGGCCGCGCAGCGGCTTACCTTACAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCGGCC ATCAACACCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCAGCCGGGACACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGA ACAGCTTGGCGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGTGCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGCCACCTGGTACCCTCAGCTC A |
| SEQ ID NO: 270 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSIVLFPSPDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTIKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 271 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA IN <u>NT</u> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMLSRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYV LPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| MOR10701 R55S | | |
| SEQ ID NO: 272 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 273 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVG <u>SS</u> STYYPDVSKG |
| SEQ ID NO: 274 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 275 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 276 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 277 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 278 (Хогиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 279 (Хогиа) | HCDR2 | GAVG <u>SS</u> |
| SEQ ID NO: 280 (Хогиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 281 (Хогиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 282 | LCDR2 | GAS |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|---|
| (Хотиа) | | |
| SEQ ID NO: 283 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 284 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 285 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGSS ¹ TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDI ² WGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 286 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGGCAGCGGCTC CGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGACCAAGGTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 287 | ДНК VH | GAGGTGCAAT ¹ GCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCGA CCTGAGACTGTCTTGGCGCCGCGAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCTGTG ACAGGCGCGTGGGCGAGCAGCACC ² ACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCGG GTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGGCGGCGGAGGACACCGCGGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGCGTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCGTACGCTC A |
| SEQ ID NO: 288 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACVETHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 289 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGSS ¹ TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDI ² WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI ³ SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYV LP ⁴ PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD G ⁵ SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC ⁶ SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| MOR10701 R55G | | |
| SEQ ID NO: 290 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 291 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVGGS ¹ TYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 292 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 293 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 294 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 295 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 296 (Хотиа) | HCDR1 | GTFSSY |
| SEQ ID NO: 297 (Хотиа) | HCDR2 | GAVGGS ¹ |
| SEQ ID NO: 298 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 299 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 300 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 301 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 302 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 303 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGGS ¹ TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWG DEGFDI ² WGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 304 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGGCAGCGGCTC CGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAG GGACCAAGGTGGAAATCAAG |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| SEQ ID NO: 305 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTCACCTTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTG ACAGGGCCGTGGGCGGAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTACGCTC A |
| SEQ ID NO: 306 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 307 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLTIVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK |
| MOR10701 R55K | | |
| SEQ ID NO: 308 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 309 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVGKSTYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 310 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 311 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 312 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 313 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 314 (Хотиа) | HCDR1 | GTFSSY |
| SEQ ID NO: 315 (Хотиа) | HCDR2 | GAVGKS |
| SEQ ID NO: 316 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 317 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 318 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 319 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 320 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 321 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGKSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLTIVTSS |
| SEQ ID NO: 322 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGC GCCAGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC CGGCACCGACTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCCACCTTCGGCCAG GGCACCAGGTGGAATCAAG |
| SEQ ID NO: 323 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAG CCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTCACCTTCAGCAGCTACGCCA TGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTG ACAGGGCCGTGGGCAAAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGTGCCAGATGGGGC GACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTACGCTC A |
| SEQ ID NO: 324 | Легкая каппа- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 325 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGKSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLTIVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT |

| | | |
|------------------------------|-------------------|---|
| | | LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| MOR10701 deletion S56 | | |
| SEQ ID NO: 326 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 327 (Кэбот) | HCDR2 | VTGAVGRTRYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 328 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 329 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 330 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 331 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPTT |
| SEQ ID NO: 332 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 333 (Хотиа) | HCDR2 | GAVGRT |
| SEQ ID NO: 334 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 335 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 336 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 337 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPT |
| SEQ ID NO: 338 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSDFTFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK |
| SEQ ID NO: 339 | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLWVSVTGAVGRTRYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGEFDIWGGQTLTVSS |
| SEQ ID NO: 340 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGCAGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCACAGCAGATTTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGCCACCAAGGTGAAATCAAG |
| SEQ ID NO: 341 | ДНК VH | GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGCAGGCTGTTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACAGGGCCCGTGGGCAGAACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCGTTACCCATCAGCCGGGCAACAGCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGGCGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGCAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGTTCCCGTACGCTCA |
| SEQ ID NO: 342 | Легкая капша-цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSDFTFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKV DDKLQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 343 | Тяжелая цепь IgG1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLWVSVTGAVGRTRYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGEFDIWGGQTLTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLTQTYICNVNHPKNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPAPELGGPVSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| MOR12609 | | |
| SEQ ID NO: 344 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 345 (Кэбот) | HCDR2 | VINGLGYTTFYADSVKG |
| SEQ ID NO: 346 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 347 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWLA |
| SEQ ID NO: 348 | LCDR2 | GASSLQS |

| | | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| (Кэбот) | | |
| SEQ ID NO: 349 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 350 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 351 (Хотиа) | HCDR2 | NGLGYT |
| SEQ ID NO: 352 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 353 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 354 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 355 (Хотиа) | LCDR3 | YSSFPPT |
| SEQ ID NO: 356 | VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTLSLQPEDFAVYQCQYSSFPPTTFGQ GPKVEIK |
| SEQ ID NO: 357 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV INGLGYTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 358 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCAATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGAIC CGGCACTGATTTACCCTGACCAATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGGTTTATTTGCCAGCAGTATTTCTTTCTACTACTCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATTA |
| SEQ ID NO: 359 | ДНК VH | CAGGTGCAATTTGGTGGAAAGCGGCGGGCGCTGGTGCACCGGGCGGCGAG CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGA TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTT ATTAATGGTCTTGGTTATACTACTTTTATGCTGATTTCTGTTAAGGGTGG TTTTACCATTTACGTTGATAATTCGAAAAACACCCCTGTATCTGCAAAATGA ACAGCCTGCGTGGGAAGATACGGCCGTGATTAATTTGCGCGCGTGGGGT GATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTTGGTGACGGTTAGCTC A |
| SEQ ID NO: 360 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTLSLQPEDFAVYQCQYSSFPPTTFGQ GPKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWV DHLQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 361 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV INGLGYTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI LSKARGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK |
| MOR12610 | | |
| SEQ ID NO: 362 (Кэбот) | HCDR1 | SYAMS |
| SEQ ID NO: 363 (Кэбот) | HCDR2 | GTGPGYGGTYYPDSVKG |
| SEQ ID NO: 364 (Кэбот) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 365 (Кэбот) | LCDR1 | RASQGISNWL |
| SEQ ID NO: 366 (Кэбот) | LCDR2 | GASSLQS |
| SEQ ID NO: 367 (Кэбот) | LCDR3 | QQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 368 (Хотиа) | HCDR1 | GFTFSSY |
| SEQ ID NO: 369 (Хотиа) | HCDR2 | GPYGG |
| SEQ ID NO: 370 (Хотиа) | HCDR3 | WGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 371 (Хотиа) | LCDR1 | SQGISNW |
| SEQ ID NO: 372 (Хотиа) | LCDR2 | GAS |
| SEQ ID NO: 373 | LCDR3 | YSSFPPT |

| | | |
|----------------|-----------------------|---|
| (Хотна) | | |
| SEQ ID NO: 374 | VL | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASLQSGVPSRFSGSGSDFTFLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTFGQ GTRKVEIK |
| SEQ ID NO: 375 | VH | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSG TGPYGGTYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 376 | ДНК VL | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGA TCGTGTGACCAATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGT GCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCGTTTATAGCGGCTCTGGATC CGGCACTGATTTTACCCTGACCAATAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTG CGTTTATATTTGCCAGCAGTATTTCTTTCTTCTTCTACCTTTGGCCAG GGTACGAAAGTTGAAATTA |
| SEQ ID NO: 377 | ДНК VH | CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGCGGCGCTGGTGCACCGGGCGGCAG CCTGCGTGTAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGGA TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGT ACTGGTCTTATGGTGGTACTTATATCTGATCTGTAAAGGGTGGT TACCATTTCAGTGATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAATGAACA GCCTGCGTGCAGGATACGGCGGTGATTTATTCGCGCGGTGGGGTGAT GAGGGTCTTGAATTTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGAAGCTTAGCTCA |
| SEQ ID NO: 378 | Легкая капша- цепь | DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASLQSGVPSRFSGSGSDFTFLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTFGQ GTRKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNDFYPREAKVQWV DHLKLSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO: 379 | Тяжелая цепь IgG1 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSG TGPYGGTYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTEPAVLQSSGLYSLSVVTVPSLSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSKDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDRL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVLTVLHQDLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK |

Другие антитела представляют собой антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, подвергнуты мутации, но последовательности которых еще по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям, представленным в табл. 1. Они включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в вариабельных областях были подвергнуты мутации по сравнению с вариабельными областями, последовательности которых представлены в табл. 1, при этом все еще сохраняется их практически такая же терапевтическая активность.

Поскольку каждое/каждый из указанных антител или их фрагментов может связываться с HER3, то последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) можно "смешивать и совмещать" для создания других связывающих HER3 антител. Связывание с HER3 указанных полученных в результате "смешения и совмещения" антител можно оценивать с помощью известных в данной области анализов связывания (например, ELISA и других анализов, описанных в разделе "Примеры"). Когда эти цепи смешивают и совмещают, то последовательность VH из конкретной пары VH/VL следует замещать структурно сходной последовательностью VH. Аналогично этому, полноразмерную последовательность тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная последовательность тяжелой цепи/полноразмерная последовательность легкой цепи следует замещать структурно сходной полноразмерной последовательностью тяжелой цепи. Аналогично этому, последовательность VL из конкретной пары VH/VL следует замещать структурно сходной последовательностью VL. Аналогично этому, полноразмерную последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерная последовательность тяжелой цепи/полноразмерная последовательность легкой цепи следует замещать структурно сходной полноразмерной последовательностью легкой цепи. Таким образом, выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, которое/который имеет вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 33, 51, 69, 87, 105, 123, 141, 159, 177, 195, 213, 231, 249, 267, 285, 303, 321, 339, 357 и 375; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 14, 32, 50, 68, 86, 104, 122, 140, 158, 176, 194, 212, 230, 248, 266, 284, 302, 320, 338, 356 и 374; при этом антитело специфически связывается с HER3 (например, человека и/или обезьяны циномогус).

HER3-связывающие антитела, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, представлены в табл. 1, или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 VH антител представлены в SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242, 254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368. Аминокислотные последовательности CDR2 VH антител представлены в SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369. Аминокислотные последовательности CDR3 VH антител представлены в SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 76, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370. Аминокислотные последовательности CDR1 VL антител представлены в SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227,

239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371. Аминокислотные последовательности CDR2 VL антител представлены в SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372. Аминокислотные последовательности CDR2 VL антител представлены в SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 133, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373. CDR-участки описывают с помощью системы Кэбота (Kabat E. A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991; Chothia и др., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917; Chothia и др., Nature 342, 1989, сс. 877-883; и Al-Lazikani и др., J. Mol. Biol. 273, 1997, сс. 927-948).

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 3; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 4; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 6; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 20; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 21; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 22; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 23; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 24; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 25.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 38; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 39; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 40; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 41; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 42; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 43.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 56; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 57; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 58; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 59; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 60; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 61.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 74; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 75; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 76; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 77; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 78; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 79.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 92; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 93; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 94; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 95; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 96; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 97.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 110; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 111; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 112; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 113; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 114; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 115.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 128; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 129; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 130; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 131; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 132; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 133.

Антитело, которое связывается с HER3, может содержать в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 146; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 147; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 148; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:

зародышевой линии, можно идентифицировать индивидуально путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела и аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии и отбора последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, которая является наиболее близкой по последовательности (т.е. имеет самый высокий % идентичности) с последовательностью человеческого антитела.

Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "выведено из" конкретной последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, может иметь различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, в результате встречающихся в естественных условиях соматических мутаций или искусственных сайтнаправленных мутаций. Однако в каркасных участках VH или VL аминокислотная последовательность отобранного человеческого антитела, как правило, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, которые свидетельствуют о том, что человеческое антитело является человеческим, при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевых линий других видов (например, последовательности мышинной зародышевой линии). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90% или по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, рекомбинантное человеческое антитело должно иметь не более 10 аминокислотных различий по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, в каркасных участках VH или VL. В некоторых случаях антитело может отличаться не более чем на 5 или даже не более чем на 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Различные полученные из зародышевых линий версии с использованием последовательностей зародышевой линии VH и VL для репрезентативного количества антител к HER3 представлены в табл. 2, где нумерация соответствует системе Кэбота. Положения CDR выделены жирным шрифтом. Условные обозначения, примененные в таблицах для последовательностей зародышевых линий, представляют собой: MOR10701-VH_3-07 обозначает CDR-петли MOR10701 в каркасных участках последовательности зародышевой линии VH 3-07 (номенклатура согласно Vbase), MOR10703-VK_L1 обозначает CDR из MOR10703 в зародышевых каркасных участках из VK_L1, где VK обозначает легкую каппа-цепь.

Таблица 2. Различные полученные из зародышевых линий версии
отобранной группы репрезентативных антител

| SEQ ID NO: | Обозначение последовательности | Аминокислотная последовательность |
|-------------------|--------------------------------|--|
| | VH-область MOR10701 | |
| SEQ ID NO: 380 | MOR10701-VH_3-07 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTAVYY CARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 381 | MOR10701-VH_3-09 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTALYYC AKWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 382 | MOR10701-VH_3-11 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 383 | MOR10701-VH_3-13 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQATGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR ENAKNSLYLQMN SLR AGDTAVYYC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 384 | MOR10701-VH_3-15 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DDSKNTLYLQMN SLK TEDTAVYYC TTWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 385 | MOR10701-VH_3-20 | EVQLVESGGGVVPRPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTALYHC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 386 | MOR10701-VH_3-21 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 387 | MOR10701-VH_3-23 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYC AKWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 388 | MOR10701-VH_3-30 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVY YCAKWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 389 | MOR10701-VH_3-30.3 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVY YCARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 390 | MOR10701-VH_3-30.5 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVY YCAKWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 391 | MOR10701-VH_3-33 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVY YCARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 392 | MOR10701-VH_3-43 | EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNSLYLQMN SLR TEDTALYY CAKWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 393 | MOR10701-VH_3-48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 394 | MOR10701-VH_3-49 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMSWFRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DGSKSIAYLQMN SLK TEDTAVYYC TRWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 395 | MOR10701-VH_3-53 | EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYC ARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 396 | MOR10701-VH_3-64 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEVY SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMG SLR AEDMAVYY CARWGDEGF DI |
| SEQ ID NO: 397 | MOR10701-VH_3-66 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYC ARWGDEGF DI |

| | | |
|-------------------|----------------------------|--|
| SEQ ID NO: 398 | MOR10701-VH_3-72 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 399 | MOR10701-VH_3-73 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQASGKGLEWV GVTGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CTRWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 400 | MOR10701-VH_3-74 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVW VSVTGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 401 | MOR10701-VH_3-d | EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYC KKWGDEGFDI |
| | VH-область MOR10703 | |
| SEQ ID NO: 402 | MOR10703-VH_3-07 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 403 | MOR10703-VH_3-09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 404 | MOR10703-VH_3-11 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 405 | MOR10703-VH_3-13 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQATGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRЕНАKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 406 | MOR10703-VH_3-15 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC TTWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 407 | MOR10703-VH_3-20 | EVQLVESGGGVVPRGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTALYHC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 408 | MOR10703-VH_3-21 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 409 | MOR10703-VH_3-23 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 410 | MOR10703-VH_3-30 | QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 411 | MOR10703-VH_3-30.3 | QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 412 | MOR10703-VH_3-30.5 | QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 413 | MOR10703-VH_3-33 | QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VAAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 414 | MOR10703-VH_3-43 | EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYY CAKWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 415 | MOR10703-VH_3-48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 416 | MOR10703-VH_3-49 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRДGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC TRWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 417 | MOR10703-VH_3-53 | EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDI |
| SEQ ID NO: 418 | MOR10703-VH_3-64 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEVV SAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYC ARWGDEGFDI |

| | | |
|-------------------|---|---|
| SEQ ID NO: 419 | MOR10703-VH_3-66 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGDEGFDDI |
| SEQ ID NO: 420 | MOR10703-VH_3-72 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC ARWGDEGFDDI |
| SEQ ID NO: 421 | MOR10703-VH_3-73 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQASGKGLEWV GAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYC TRWGDEGFDDI |
| SEQ ID NO: 422 | MOR10703-VH_3-74 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVW VSAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARWGDEGFDDI |
| SEQ ID NO: 423 | MOR10703-VH_3-d | EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYC KKWGDEGFDDI |
| | VK-область MOR10701 | |
| SEQ ID NO: 424 | MOR10701-VK1_O12 (такая же как MOR10701 wt) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 425 | MOR10701-VK1_O2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 426 | MOR10701-VK1_O18 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 427 | MOR10701-VK1_O8 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 428 | MOR10701-VK1_A20 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKVPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 429 | MOR10701-VK1_A30 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKRLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 430 | MOR10701-VK1_L14 | NIQMTQSPSAMSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWFQKPKGKVPKHLIY YGASSLQSGVPSRFSGSGSDEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 431 | MOR10701-VK1_L1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWFQKPGKAPKSLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 432 | MOR10701-VK1_L15 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPEKAPKSLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 433 | MOR10701-VK1_L4 | AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 434 | MOR10701-VK1_L18 | AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 435 | MOR10701-VK1_L5 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 436 | MOR10701-VK1_L19 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 437 | MOR10701-VK1_L8 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 438 | MOR10701-VK1_L23 | AIRMTQSPFSLASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPAKAPKLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 439 | MOR10701-VK1_L9 | AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQSEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 440 | MOR10701-VK1_L24 | VIWMTQSPSSLSASTGDRVTISCRASQGISNWLAWYQKPGKAPPELLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQSEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 441 | MOR10701-VK1_L11 | AIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 442 | MOR10701-VK1_L12 | DIQMTQSPSTLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDEFTLTISLQPDFFATYYCQQYSSFPPT |
| | VK-область MOR10701 | |
| SEQ ID NO: 443 | MOR10703-VK1_O12 (такая же как MOR10703 wt) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 444 | MOR10703-VK1_O2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 445 | MOR10703-VK1_O18 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 446 | MOR10703-VK1_O8 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT |

| | | |
|-------------------|------------------|---|
| SEQ ID NO: 447 | MOR10703-VK1_A20 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKVPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDVATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 448 | MOR10703-VK1_A30 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKRLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 449 | MOR10703-VK1_L14 | NIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNWLAWFQKPGKVPKHLIY YGASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 450 | MOR10703-VK1_L1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKSLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 451 | MOR10703-VK1_L15 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPEKAPKSLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 452 | MOR10703-VK1_L4 | AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 453 | MOR10703-VK1_L18 | AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 454 | MOR10703-VK1_L5 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 455 | MOR10703-VK1_L19 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 456 | MOR10703-VK1_L8 | DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 457 | MOR10703-VK1_L23 | AIRMTQSPFSLASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPAKAPKLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 458 | MOR10703-VK1_L9 | AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLOSEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 459 | MOR10703-VK1_L24 | VIWMTQSPFSLASASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQKPAKAPKLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLOSEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 460 | MOR10703-VK1_L11 | AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYSSFPPT |
| SEQ ID NO: 461 | MOR10703-VK1_L12 | DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLOPDDFATYYCQYSSFPPT |

Таблица 3. JH-сегменты

| | | |
|----------------|-----|------------|
| SEQ ID NO: 462 | JH1 | WGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 463 | JH2 | WGRGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 464 | JH3 | WGQTMVTVSS |
| SEQ ID NO: 465 | JH4 | WGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 466 | JH5 | WGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 467 | JH6 | WGQTTVTVSS |

Таблица 4. JK-сегменты

| | | |
|----------------|-----|------------|
| SEQ ID NO: 468 | JK1 | FGQGTKVEIK |
| SEQ ID NO: 469 | JK2 | FGQGTKLEIK |
| SEQ ID NO: 470 | JK3 | FGPGTKVDIK |
| SEQ ID NO: 471 | JK4 | FGGGTKVEIK |
| SEQ ID NO: 472 | JK5 | FGQGTRLEIK |

Можно использовать любую комбинацию последовательностей, полученных из зародышевых последовательностей VH, с JH-сегментами. Репрезентативные примеры комбинаций представлены в табл. 5.

Таблица 5. Репрезентативные примеры комбинаций последовательностей, полученных из зародышевых последовательностей VH, с JH-сегментами.

| | | |
|----------------|----------------------|--|
| SEQ ID NO: 473 | MOR10701-VH_3-15_JH1 | EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGVTVGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTE DTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 474 | MOR10701-VH_3-15_JH3 | EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGVTVGAVGRSTIYPDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTE DTAVYYCTTWGDEGFDIWGQTMVTVSS |
| SEQ ID NO: 475 | MOR10703-VH_3-15_JH1 | EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTE DTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO: 476 | MOR10703-VH_3-15_JH3 | EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTE DTAVYYCTTWGDEGFDIWGQTMVTVSS |

Можно использовать любую комбинацию последовательностей, полученных из зародышевых последовательностей VL, с JK-сегментами. Репрезентативные примеры комбинаций представлены в табл. 6.

Таблица 6, Репрезентативные примеры комбинаций последовательностей, полученных из зародышевых последовательностей VK, с JK-сегментами

| | | |
|----------------|----------------------|--|
| SEQ ID NO: 477 | MOR10701-VKI_O2_JK1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSF P TTFGGQTKVEIK |
| SEQ ID NO: 478 | MOR10701-VKI_O2_JK4 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSF P TTFGGQTKVEIK |
| SEQ ID NO: 479 | MOR10703-VKI_A20_JK4 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSS F PTTFGGQTKVEIK |
| SEQ ID NO: 480 | MOR10703-VKI_A20_JK1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSS F PTTFGGQTKVEIK |

При объединении VH с JH, и VK с JK, можно использовать любую комбинацию VH или JH с VK или JK. Для каждого антитела любую из полученных из зародышевой линии областей VH можно объединять с любой из полученных из зародышевой линии областей VK (VL). Некоторое количество репрезентативных примеров комбинаций представлено в табл. 7.

Таблица 7. Репрезентативные примеры комбинаций, полученных из зародышевых линий последовательностей

| | | |
|----------------|----------------------|--|
| | Комбинация 1 | |
| SEQ ID NO: 481 | MOR10701-VH_3-15_JH3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGTGAVGRSTYYPDSVKGKRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSKTED TAVYYCTTWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS |
| SEQ ID NO: 482 | MOR10701-VKI_A30_JK4 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPK RLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSS F PTTFGGQTKVEIK |
| | Комбинация 2 | |
| SEQ ID NO: 483 | MOR10701-VH_3-30_JH1 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWWAVTGAVGRSTYYPDSVKGKRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSRAE DTAVYYCAKWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS |
| SEQ ID NO: 484 | MOR10701-VKI_L1_JK2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWFQQKPGKAPKS LIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSF P TTFGGQTKLEIK |
| | Комбинация 3 | |
| SEQ ID NO: 485 | MOR10701-VH_3-30_JH2 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWWAVTGAVGRSTYYPDSVKGKRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSRAE DTAVYYCAKWGDEGFDIWGRGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 486 | MOR10701-VKI_L1_JK2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWFQQKPGKAPKS LIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSF P TTFGGQTKLEIK |
| | Комбинация 4 | |
| SEQ ID NO: 487 | MOR10703-VH_3-20_JH5 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWWVAINSQKSTYYADSVKGRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSRAED TALYHRCARWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS |
| SEQ ID NO: 488 | MOR10703-VKI_L15_JK3 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKS LIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSF P TTFGGQTKVDIK |
| | Комбинация 5 | |
| SEQ ID NO: 489 | MOR10703-VH_3-33_JH2 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWWAAINSQKSTYYADSVKGRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCARWGDEGFDIWGRGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 490 | MOR10703-VKI_A20_JK1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLI YIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSS F PTTFGGQTKVEIK |
| | Комбинация 6 | |
| SEQ ID NO: 491 | MOR10703-VH_3-33_JH3 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWWAAINSQKSTYYADSVKGRFITSRDSDSKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCARWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS |
| SEQ ID NO: 492 | MOR10703-VKI_A20_JK2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLI YIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSS F PTTFGGQTKLEIK |

Вариабельная область тяжелой цепи может содержать последовательность Хаа₁-H₁CDR1-Хаа₂-H₂CDR2-Хаа₃-H₃CDR3-Хаа₄, в которой H₁CDR1, H₂CDR2, H₃CDR3 тяжелой цепи представляют собой любые CDR тяжелой цепи, выбранные из представленных в табл. 1 и 2. Последовательность может представлять собой следующую последовательность, приведенную только с целью иллюстрации:

Хаа₁ - SYAMS - Хаа₂ - AINSQKSTYYADSVKG - Хаа₃ - WGDEGFDI - Хаа₄ (SEQ ID NO: 493),

в которой Хаа₁ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 30 аминокислот;

Хаа₂ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 14 аминокислот;

Хаа₃ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 32 аминокислот;

Хаа₄ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 11 аминокислот.

Варибельная область легкой цепи может содержать последовательность Хаа₁-LCDR1-Хаа₂-LCDR2-Хаа₃-LCDR3-Хаа₄, в которой LCDR1, LCDR2, LCDR3 легкой цепи представляют собой любые CDR легкой цепи, выбранные из представленных в табл. 1 и 2. Последовательность может представлять собой следующую последовательность, приведенную только с целью иллюстрации:

Хаа₁ - RASQGISNWLА - Хаа₂ - GASSLQS - Хаа₃ - QQYSSFPTT - Хаа₄ (SEQ ID NO: 494),

в которой Хаа₁ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 23 аминокислот;

Хаа₂ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 15 аминокислот;

Хаа₃ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 32 аминокислот; и

Хаа₄ обозначает каркасный участок, состоящий из любых 10 аминокислот.

Антитела, можно выводить из одноцепочечных антител, димерных антител (диабоди), доменных антител, нанотел (нанободи) и юнибоди (антитела, созданные с помощью технологии UniBody™). "Одноцепочечное антитело" (scFv) состоит из одной полипептидной цепи, содержащей VL-область, связанную с VH-областью, в которой пара VL-область и VH-область образуют одновалентную молекулу. Одноцепочечное антитело можно получать с помощью методов, известных в данной области (см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426 и Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 5879-5883). "Димерное ("disbud") антитело" состоит из двух цепей, при этом каждая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, соединенную с переменной областью легкой цепи на одной и той же полипептидной цепи, которые связаны коротким линкером, при этом две области на одной и той же цепи не спарены друг с другом, но спарены с комплементарными областями на другой цепи с образованием биспецифической молекулы. Методы получения димерных антител известны в данной области (см., например, Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448; Poljak и др., Structure 2, 1994, сс. 1121-1123). Доменные антитела (dAb) представляют собой небольшие функциональные связывающие единицы антител, соответствующие переменным областям либо тяжелых, либо легких цепей антител. Доменные антитела легко экспрессировать в системах клеток бактерий, дрожжей и млекопитающих. Дополнительные сведения о доменных антителах и методах их получения известны в данной области (см., например, US № 6291158; 6582915; 6593081; 6172197; 6696245; европейские патенты 0368684 и 0616640; WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609). Нанотела выводят из тяжелых цепей антитела. Нанотело, как правило, состоит из одного переменного домена и двух константных доменов (CH2 и CH3) и сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Нанотела можно получать с помощью методов, известных в данной области (см., например, US № 6765087, US № 6838254, WO 06/079372). Юнибоди состоят из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи антитела изотипа IgG4. Юнибоди можно получать путем удаления шарнирной области антитела изотипа IgG4. Дополнительные сведения о юнибоди и методах их получения можно почерпнуть из WO 2007/059782.

Гомологичные антитела

Антитело или его фрагмент может содержать аминокислотные последовательности, гомологичные последовательностям, которые представлены в табл. 1, и антитело связывается с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус) и сохраняет требуемые функциональные свойства антител, представленных в табл. 1.

Например, выделенное моноклональное антитело (или его функциональный фрагмент) может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 33, 51, 69, 87, 105, 123, 141, 159, 177, 195, 213, 231, 249, 267, 285, 303, 321, 339, 357 и 375; переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 14, 32, 50, 68, 86, 104, 122, 140, 158, 176, 194, 212, 230, 248, 266, 284, 302, 320, 338, 356 и 374; антитело связывается с белком HER3 (например, с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус) и нейтрализует сигнальную активность HER3, что можно измерять с помощью анализа фосфорилирования или по другим показателям, свидетельствующим о передаче сигналов HER (например, анализы фосфо-HER3, анализы фосфо-Akt, анализы клеточной пролиферации и блокады лиганда, которые описаны в разделе "Примеры"). Нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи родительского антитела и последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих. Другие антитела могут содержать аминокислоты или нуклеиновые кислоты, измененные в результате мутаций, но которые все еще идентичны по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 98% указанным выше последовательностям. Некоторые антитела могут включать мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот изменены в результате мутаций, таких как делеция, инсерция или замена аминокислот, в переменных областях по сравнению с переменными областями, представленными в указанных выше последовательностях.

Аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными последовательностям, представленным в табл. 1. Аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичны за исключением аминокислотных замен, затрагивающих не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положений. Антитело, содержащее VH- и VL-области, обладающие высокой (т.е. 80% или более) идентичностью VH- и VL-областям антител, описанным в табл. 1, можно получать путем мутагенеза (например, сайтнаправленного или опосредуемого ПЦР мутагенеза) с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в отношении сохранения функции с помощью приведенных в настоящем описании функциональных анализов.

Нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи могут быть на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны указанным выше последовательностям.

В контексте настоящего описания "процент идентичности" между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности обозначает количество идентичных положений/общее количество положений \times 100), принимая во внимание количество брешей и длину каждой брешы, которую необходимо интродуцировать для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно осуществлять с помощью описанного ниже в примерах математического алгоритма (но, не ограничиваясь только им).

Белковые последовательности, можно применять также в качестве "запрашиваемой последовательности" при осуществлении поиска в доступных научной общественности базах данных, например, в отношении идентичности с родственными последовательностями. Такой поиск можно осуществлять с использованием программы BLAST (версия 2.0), разработанной Altschul и др., J.Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410.

Антитела с консервативными модификациями

Антитело может иметь переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или нескольких указанных последовательностей CDR представляют собой специфические аминокислотные последовательности, или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства HER3-связывающих антител.

Выделенное моноклональное антитело к HER3 или его фрагмент может состоять из переменной области тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменной области легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где: аминокислотные последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242, 254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368 и их консервативные модификации; аминокислотные последовательности CDR2 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369 и их консервативные модификации; аминокислотные последовательности CDR3 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 76, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370 и их консервативные модификации; аминокислотные последовательности CDR1 переменной области легкой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227, 239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371 и их консервативные модификации; аминокислотные последовательности CDR2 переменной области легкой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372 и их консервативные модификации; аминокислотные последовательности CDR3 переменной области легкой цепи выбирают из группы, которая включает SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 133, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373 и их консервативные модификации; где антитело или его фрагмент специфически связывается с HER3 и нейтрализует активность HER3 путем ингибирования пути передачи сигнала HER, что можно измерять с помощью анализа фосфорилирования или по другим показателям, свидетельствующим о передаче сигнала HER (например, анализы фосфо-HER3, анализы фосфо-Akt, анализы клеточной пролиферации и блокады лиганда, которые описаны в разделе "Примеры").

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом антитела, которые взаимодействуют (например, путем связывания, создания стерической помехи, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с тем же эпитопом, что и HER3-связывающие антитела, представлены в табл. 1 и указаны на фиг. 7. Так, дополнительные антитела можно идентифицировать по их способности к перекрестной кон-

курении (например, к статистически значимому конкурентному ингибированию связывания) с другими антителами, с помощью анализов связывания HER3. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител с белком HER3 (например, HER3 человека и/или обезьяны циномоглус) свидетельствует о том, что тестируемое антитело может конкурировать с указанным антителом за связывание с HER3; согласно одной из возможных теорий такое антитело может связываться с тем же или родственным (например, структурно подобным или находящимся в пространственной близости) эпитопом на белке HER3, что и антитело, с которым оно конкурирует. Антитело, которое связывается с тем же эпитопом на HER3, может представлять собой человеческое моноклональное антитело. Указанные человеческие моноклональные антитела можно получать и выделять согласно представленным в настоящем описании методам.

Антитело или его фрагмент может связываться как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, поддерживая тем самым HER3 в неактивной конформации, которая препятствует экспонированию петли димеризации, присутствующей в домене 2. Это препятствует гетеродимеризации с другими представителями семейства, такими как HER1, HER2 и HER4. Антитела или их фрагменты ингибируют как зависимую от лиганда, так и независимую от лиганда трансдукцию сигнала HER3.

Антитело или его фрагмент может связываться как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, но не блокирует одновременное связывание лиганда HER3, такого как нейрегулин. Не вдаваясь в какую-либо теорию, можно предположить, что антитело или его фрагмент связывается как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, поддерживая тем самым HER3 в неактивной конформации, но, не блокируя сайт связывания лиганда на HER3. В результате лиганд HER3 (например, нейрегулин) обладает способностью связываться с HER3 одновременно с антителом или его фрагментом.

Антитела или их фрагменты могут ингибировать как зависимую от лиганда, так и независимую от лиганда активацию HER3, не препятствуя связыванию лиганда. Это рассматривается как преимущество по следующим причинам:

I) терапевтическое антитело может найти клиническое применение в отношении более широкого спектра опухолей, чем антитело, направленное только на один механизм активации HER3 (т.е. зависимой от лиганда или независимой от лиганда), поскольку каждый механизм обуславливает различные типы опухолей;

II) терапевтическое антитело может обладать эффективностью в отношении разных типов опухолей, при которых одновременно участвуют оба механизма активации HER3. Антитело, направленное только на один механизм активации HER3 (т.е. зависимой от лиганда или независимой от лиганда), должно обладать меньшей эффективностью или не обладать эффективностью в отношении этих типов опухолей;

III) на эффективность антитела, которое ингибирует зависимую от лиганда активацию HER3, не препятствуя при этом связыванию лиганда, с меньшей вероятностью будет оказывать вредное воздействие возрастающие концентрации лиганда. Это может приводить либо к повышенной эффективности в отношении типа опухоли, вызываемой очень высокими концентрациями лиганда HER3, либо к пониженной предрасположенности к развитию устойчивости к лекарственным средствам в том случае, когда устойчивость опосредована повышающей регуляцией лигандов HER3;

IV) антитело, которое ингибирует активацию HER3 путем стабилизации неактивной формы, должно быть менее подвержено к устойчивости к лекарственным средствам, связанными с альтернативными механизмами активации HER3.

Следовательно, такие антитела можно применять для лечения состояний, в отношении которых существующие в настоящее время терапевтические антитела являются клинически неэффективными.

Сконструированные и модифицированные антитела

Антитело можно получать также с использованием антитела, которое имеет одну или несколько указанных в настоящем описании последовательностей VH и/или VL, в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, где модифицированное антитело может иметь измененные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно создавать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. VH и/или VL), например в одном или нескольких CDR-участках и/или в одном или нескольких каркасных участках. В дополнительном или альтернативном варианте антитело можно создавать путем модификации остатков в константной(ых) области(ях), например, для изменения эффекторной(ых) функции(ий) антитела.

Для осуществления одного из типов конструирования переменной области можно применять трансплатацию CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями в основном посредством аминокислотных остатков, локализованных в шести гиперпеременных участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине между аминокислотными остатками в CDR индивидуальных антител существуют более значительные различия, чем в последовательностях вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большую часть взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных встречающихся в естественных условиях антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые содержат естественности CDR из конкретного встречающегося в естественных условиях антитела, полученные путем трансплатации в

последовательности каркасных участков из других антител с другими свойствами (см., например, Riechmann и др., *Nature* 332, 1998, сс. 323-327; Jones и др., *Nature*, 321, 1986, сс. 522-525; Queen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1989, сс. 10029-10033; US № 5225539 на имя Winter и US №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Таким образом, выделенное HER3-связывающее моноклональное антитело или его фрагмент может содержать варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательности CDR1, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242, 254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368; последовательности CDR2, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369; последовательности CDR3, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 76, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370 соответственно; варибельную область легкой цепи, включающую последовательности CDR1, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227, 239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371; последовательности CDR2, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372; и последовательности CDR3, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 135, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373 соответственно. Таким образом, указанные антитела содержат последовательности CDR VH и VL моноклональных антител, кроме того, они могут содержать различные последовательности каркасных участков указанных антител. Указанные последовательности каркасных участков можно получать из публичных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые содержат последовательности генов зародышевой линии антител. Например, последовательности ДНК генов зародышевой линии варибельных областей человеческих тяжелых и легких цепей можно найти в базе данных последовательностей человеческой зародышевой линии "Vbase" (доступной в Интернете на сайте www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также у Kabat E. A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991, 15-ое изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917; Chothia и др., *Nature* 342, 1989, сс. 877-883; и Al-Lazikani и др., *J. Mol. Biol.* 273, 1997, сс. 927-948; Tomlinson и др., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, сс. 776-798; и Cox и др., *Eur. J Immunol.* 24, 1994, сс. 827-836; содержание каждой из публикаций специально включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Примером последовательностей каркасных участков, предназначенных для применения в антителах, являются последовательности, структурно подобные последовательностям каркасных участков, которые входят в отобранные антитела, например консенсусные последовательности и/или последовательности каркасных участков, которые входят в моноклональные антитела. Последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL можно трансплантировать в каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную последовательности гена иммуноглобулина зародышевой линии, из которого выведена последовательность каркасного участка, или последовательности CDR можно трансплантировать в каркасные участки, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было установлено, что в определенных случаях целесообразно изменять посредством мутации остатки в каркасных участках для поддержания или повышения способности антитела связываться с антигеном (см., например, US № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Другим типом модификации варибельной области является мутация аминокислотных остатков в CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH- и/или VL-областей, которая повышает одну или несколько способностей к связыванию (например, аффинность) представляющего интерес антитела, что называют "созреванием аффинности". Для интродукции мутации(й) можно применять сайтнаправленный мутагенез или ПЦР-опосредуемый мутагенез, и воздействия на связывание антитела или на другое представляющее интерес функциональное свойство можно оценивать с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, представленных в настоящем описании и описанных в разделе "Примеры". Можно интродуцировать консервативные модификации (указанные выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции. Кроме того, как правило, изменяют не более 1, 2, 3, 4 или 5 остатков в CDR-участке.

Таким образом, выделенные HER3-связывающие моноклональные антитела или их фрагменты могут включать варибельную область тяжелой цепи, содержащую: CDR1-участок VH-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242,

254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242, 254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368; CDR2-участок VH-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369; CDR3-участок VH-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 76, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370; или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 76, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370; CDR1-участок VL-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227, 239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227, 239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371; CDR2-участок VL-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372; и CDR3-участок VL-области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 135, 139, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 135, 139, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373.

Трансплантация фрагментов антител в альтернативные остовы или каркасы

Широкое разнообразие остовов или каркасов антител/иммуноглобулинов можно применять, если образующийся полипептид включает по меньшей мере один связывающий участок, который специфически связывается с HER3. Такие остовы или каркасы включают 5 основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов или их фрагментов, и включают иммуноглобулины других видов животных, которые предпочтительно имеют гуманизированные аспекты. Специалисты в данной области продолжают открывать и создавать новые остовы, каркасы и фрагменты.

Антитела можно создавать на основе неиммуноглобулиновых остовов с использованием неиммуноглобулиновых каркасов, в которые можно трансплантировать CDR. Можно применять известные или те, которые могут быть открыты в будущем, неиммуноглобулиновые остовы и каркасы, если они содержат связывающий участок, специфический для белка-мишени HER3 (например, HER3 человека и/или обезьяны циномогус). Известные неиммуноглобулиновые остовы или каркасы включают (но, не ограничиваясь только ими) фибронектин (фирма Comround Therapeutics, Inc., Уолтем, шт. Массачусетс), ангириин (фирма Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария), доменные антитела (фирма Domantis, Ltd. (Кэмбридж, шт. Массачусетс и фирма Ablynx nv (Цвинаарде, Бельгия)), липокалин (фирма Pieris Proteo-lab AG, Фрейзинг, Германия), небольшие модульные иммунологические фармацевтические агенты (фирма Trubion Pharmaceuticals Inc., Сиэтл, шт. Вашингтон), макситела (фирма Avidia, Inc. (Маунтин-Вью, шт. Калифорния), белок А (фирма Affibody AG, Швеция) и аффилин (гамма-кристаллин или убики-тин) (фирма Scil Proteins GmbH, Галле, Германия).

Основой фибронектиновых каркасов является домен фибронектина типа III (например, десятый модуль фибронектина типа III (домен 10 Fn3)). Домен фибронектина типа III несет 7 или 8 бета-цепей, которые распределены между двумя бета-складками, которые сами упакованы друг напротив друга с образованием ядра белка, и дополнительно содержат петли (аналоги CDR), которые соединяют бета-цепи друг с другом и являются доступными для растворителя. Известно по меньшей мере три таких петли на каждом крае бета-складчатого "сэндвича", при этом край является границей белка, перпендикулярной к направлению бета-цепей (US № 6818418). Эти каркасы, основой которых является фибронектин, не представляют собой иммуноглобулин, хотя общая укладка очень похожа на укладку наименьшего обладаю-

шего функциональной активностью фрагмента антитела, т.е. варибельной области тяжелой цепи, который содержит полный распознающий антиген компонент в IgG представителей верблюжьих и лам. Благодаря указанной структуре антитела, не представляющее собой иммуноглобулин, имитирует антиген-связывающие свойства, которые напоминают по природе и аффинности свойства антител. Эти каркасы можно применять для стратегии рандомизации и перестановки петель *in vitro*, что подобно процессу созревания аффинности антител *in vivo*. Такие молекулы, основой которых является фибронектин, можно применять в качестве каркасов, в которых области петель молекулы можно заменять на CDR с помощью стандартных методов клонирования.

Технология анкиринования основана на применении белков, несущих выведенные из анкирина повторяющиеся модули в качестве каркасов для варибельных областей, которые можно использовать для связывания с различными мишенями. Повторяющийся анкириновый модуль представляет собой состоящий из 33 аминокислот полипептид, который содержит две антипараллельные α -спирали и β -петли. Связывание варибельных областей максимально оптимизируют с помощью рибосомального дисплея.

Авимеры получают из встречающегося в естественных условиях содержащего А-домен белка, такого как HER3. Эти домены используются в естественных условиях для белок-белковых взаимодействий, и у человека структурной основой более чем 250 белков являются А-домены. Авимеры состоят из нескольких различных мономеров "А-домена" (2-10), сцепленных с помощью аминокислотных линкеров. Можно создавать авимеры, которые могут связываться с антигеном-мишенью, с использованием методологии, описанной, например, в публикациях заявок на патент США № 20040175756; 20050053973; 20050048512; и 20060008844.

Обладающие аффинностью лиганды фирмы Affibody представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трехспирального пучка, основой которого является каркас одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых произвольно использовали для создания библиотек Affibody с большим количеством вариантов лиганда (см., например, US № 5831012). Молекулы Affibody напоминают антитела, их молекулярная масса составляет 6 кДа, для сравнения молекулярная масса антител составляет 150 кДа. Несмотря на небольшой размер, сайт связывания молекул Affibody подобен сайту связывания антитела.

Антикарины представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris ProteoLab AG. Их получают из липокалинов, широко распространенной группы небольших и эффективных белков, которые, как правило, принимают участие в физиологическом транспорте или хранении чувствительных к химическим агентам или нерастворимых соединений. Несколько встречающихся в естественных условиях липокалинов обнаружено в тканях или общей воде организма человека. Их белковая архитектура напоминает структуру иммуноглобулинов с гиперварибельными петлями на вершине жесткого остова. Однако в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов липокарины состоят из одной полипептидной цепи, содержащей 160-180 аминокислотных остатков, т.е. несколько более крупной, чем один домен иммуноглобулина. Набор из четырех петель, которые образуют связывающий карман, обладает выраженной структурной пластичностью и допускает широкое разнообразие боковых цепей. Таким образом, при использовании соответствующего процесса сайту связывания можно придавать новую форму, предназначенную для распознавания с высокой аффинностью и специфичностью заранее определенных молекул-мишеней различной формы. Один из белков семейства липокалинов, а именно связывающий билин белок (BBP) из *Pieris brassicae* (капустная белянка), использовали для создания антикаринов путем мутагенеза, затрагивающего четыре петли. Одной из заявок на патент, в которых описаны антикарины, приведенной в качестве примера, является опубликованная заявка PCT WO 1999/16873.

Молекулы аффилинов представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые разработаны с целью достижения специфических аффинностей к белкам и небольшим молекулам. Новые молекулы аффилинов можно очень быстро отбирать из двух библиотек, основой каждой из которых являются различные полученные из человеческого организма белки-каркасы. Молекулы аффилинов не обладают какой-либо структурной гомологией с белками иммуноглобулинов. В настоящее время применяют два аффилиновых каркаса, одним из которых является гамма-кристаллин, человеческий структурный белок хрусталика глаза, а другим являются белки суперсемейства "убикитина". Оба человеческих каркаса имеют очень малый размер, характеризуются высокой термостойкостью и практически устойчивы к изменениям значений pH и действию денатурирующих агентов. Указанная высокая стабильность главным образом является результатом расширенной бета-складчатой конформации белков. Примеры выведенных из гамма-кристаллина белков описаны в WO 2001/04144, а примеры "убикитиноподобных" белков описаны в WO 2004/106368.

Миметики белковых эпитопов (РЕМ) представляют собой имеющие средний размер, циклические, напоминающие пептиды молекулы (ММ 1 -2 кДа), которые имитируют вторичные структуры белков типа бета-"шпилек", т.е. основную вторичную структуру, участвующую в белок-белковых взаимодействиях.

Fab-фрагменты можно превращать в молчалий IgG1-формат путем изменения Fc-области. Например, антитела, представленные в табл., можно превращать в IgG-формат.

Человеческие или гуманизированные антитела

Полностью человеческие антитела специфически связываются с белком HER3 (например, HER3 человека и/или обезьяны циномогус/мышь/крысы). По сравнению с химерными или гуманизированными антителами человеческие HER3-связывающие антитела обладают также пониженной антигенностью при введении человеку.

Человеческие HER3-связывающие антитела можно создавать с помощью методов, известных в данной области. Например, технологию "гуманизации" применяют для превращения нечеловеческих антител в сконструированные человеческие антитела. В публикации патента США № 2005/0008625 описан метод *in vivo* замены варибельной области нечеловеческого антитела на варибельную область человеческого антитела с сохранением или даже улучшением характеристик связывания по сравнению с нечеловеческим антителом. Метод основан на зависящей от эпитопа замене варибельных областей нечеловеческого референс-антитела на полностью человеческое антитело. Образовавшееся человеческое антитело, как правило, имеет неродственную структуру относительно нечеловеческого референс-антитела, но оно связывается с тем же эпитопом на том же антигене, что и референс-антитело. В целом, метод состоит в следующем: серийный основанный на зависящей от эпитопа комплементарной замене подход осуществляют путем создания конкуренции в клетках между "конкурентом" и библиотекой разнообразных гибридов референс-антитела ("тестируемые антитела") за связывание с лимитирующими количествами антигена в присутствии репортерной системы, которая реагирует на связывание тестируемого антитела с антигеном. Конкурент может представлять собой референс-антитело или его производное, такое как одноцепочечный Fv-фрагмент. Конкурент может представлять собой также встречающийся в естественных условиях или искусственный лиганд антигена, который связывается с тем же эпитопом, что и референс-антитело. Единственные требования, предъявляемые к конкуренту, заключаются в том, что он должен связываться с тем же эпитопом, что и референс-антитело, и что он должен конкурировать с референс-антителом за связывание с антигеном. Тестируемые антитела имеют одну антигенсвязывающую V-область, общую с V-областью нечеловеческого референс-антитела, и другую V-область, произвольно выбранную из другого источника, такого как библиотека набора человеческих антител. V-область, общая с V-областью нечеловеческого референс-антитела, служит в качестве "проводника", позиционирующего тестируемые антитела на тот же эпитоп антигена и в той же ориентации, в результате чего селекция идет в направлении наиболее высокого сродства к референс-антителу.

Для выявления требуемых взаимодействий между тестируемыми антителами и антигеном можно применять большое количество типов репортерных систем. Например, комплементирующие репортерные фрагменты можно связывать с антигеном и тестируемым антителом соответственно, так что активация репортера в результате комплементации фрагментом происходит только тогда, когда тестируемое антитело связывается с антигеном. Когда слияния тестируемое антитело- и антиген-репортерный фрагмент совместно экспрессируют с конкурентом, активация репортера начинает зависеть от способности тестируемого антитела конкурировать с конкурентом, которая пропорциональна аффинности тестируемого антитела к антигену. Другие репортерные системы, которые можно применять, включают реактиватор самоингибирующейся репортерной системы реактивации (RAIR), описанный в заявке на патент США сер. № 10/208730 (публикация № 2003/0198971), или конкурентную систему активации, описанную в заявке на патент США, сер. № 10/076845 (публикация № 2003/0157579).

С помощью серийной системы, основанной на зависящей от эпитопа комплементарной замене, осуществляют селекцию с целью идентификации клеток, экспрессирующих индивидуальное тестируемое антитело в сочетании с конкурентом, антигеном и компонентами, представляющими собой репортер. В этих клетках каждое тестируемое антитело конкурирует "один на один" с конкурентом за связывание с лимитирующим количеством антигена. Активность репортера пропорциональна количеству антигена, связанного с тестируемым антителом, что, в свою очередь, пропорционально аффинности тестируемого антитела к антигену и стабильности тестируемого антитела. Тестируемые антитела сначала отбирают на основе их активности относительно активности референс-антитела, когда оно экспрессируется аналогично тестируемому антителу. В результате первого цикла селекции получают массив "гибридных" антител, каждое из которых включает одну и ту же нечеловеческую V-область из референс-антитела и человеческую V-область из библиотеки, и каждое из которых связывается с тем же эпитопом на антигене, что и референс-антитело. Одно или несколько гибридных антител, отобранных в первом цикле, должны обладать аффинностью к антигену, сопоставимой или превышающей аффинность референс-антитела.

На второй стадии замены V-области применяют человеческие V-области, отобранные на первой стадии, в качестве "проводников" при отборе замен на человеческие области оставшейся V-области нечеловеческого референс-антитела, используя другую библиотеку родственных человеческих V-областей. Гибридные антитела, отобранные в первом цикле, можно применять также в качестве конкурентов для второго цикла селекции. В результате второго цикла селекции получают массив полностью человеческих антител, структурно отличных от референс-антитела, но обладающих способностью конкурировать с референс-антителом за связывание с одним и тем же антигеном. Некоторые из отобранных человеческих антител связываются с тем же эпитопом на том же антигене, с которым связывается референс-антитело. Из этих отобранных человеческих антител одно или несколько связывается(ются) с тем же эпитопом с

аффинностью, сопоставимой или превышающей аффинность референс-антитела.

Используя одно из мышинных или химерных HER3-связывающий антител, описанных выше, в качестве референс-антитела, этот метод легко адаптировать для создания человеческих антител, которые связываются с человеческим HER3 с такой же специфичностью связывания и с такой же или с улучшенной аффинностью связывания. Кроме того, указанные человеческие HER3-связывающие антитела можно также получать на коммерческой основе от компаний, которые производят человеческие антитела с целью продажи, таких, например, как фирма KaloBios, Inc. (Маунтин-Вью, шт. Калифорния).

Верблюжьи антитела

Белки антител, полученные из представителей семейства двугорбых и одногорбых верблюдов (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включая представителей животных Нового Света, таких как различные виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), охарактеризованы в отношении их размера, структурной сложности и антигенности в отношении человека. Установлено, что некоторые антитела типа IgG из этого семейства млекопитающих в естественных условиях лишены легких цепей и поэтому отличаются по структуре от типичной состоящей из четырех цепей четвертичной структуры с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями, характерной для антител из организма других животных (см. PCT/EP93/02214 (WO 94/04678, опубликована 3 марта 1994 г.)).

Участок верблюжьего антитела, представляющий собой небольшую индивидуальную вариабельную область, обозначенную как VHH, можно создавать с помощью генной инженерии с получением небольшого белка, обладающего высокой аффинностью к мишени, что приводит к получению низкомолекулярного выведенного из антитела белка, который обозначают как "верблюжье нанотело" (см. US № 5759808, выданный 2 июня 1998 г.; см. также Stijlemans и др., *J Biol Chem* 279, 2004, сс. 1256-1261; Dumoulin и др., *Nature* 424, 2003, сс. 783-788; Pleschberger и др. *Bioconjugate Chem* 14, 2003, сс. 440-448; Cortez-Retamozo и др., *Int J Cancer* 89, 2002, сс. 456-462; и Lauwereys и др., *EMBO J* 17, 1998, сс. 3512-3520). Созданные библиотеки верблюжьих антител и фрагментов антител доступны на коммерческой основе, например, от фирмы Ablynx, Гент, Бельгия (например, US № 2006/0115470; фирмы Domantis (US № 2007/0065440, US № 2009/0148434). Аналогично другим антителам, полученным из видов кроме человека, аминокислотную последовательность верблюжьего антитела можно изменять рекомбинантно с получением последовательности, в большей степени напоминающей человеческую последовательность, т.е. нанотело можно "гуманизировать". Таким путем можно дополнительно понижать естественную низкую антигенность верблюжьих антител для людей. Верблюжье нанотело имеет молекулярную массу, составляющую примерно 1/10 от молекулярной массы человеческого IgG, а физический диаметр белка составляет лишь несколько нанометров. Одной из связанных с малым размером особенностей является способность верблюжьих нанотел связываться с антигенными сайтами, которые являются функционально незаметными для более крупных белковых антител, т.е. верблюжьи нанотела можно применять в качестве реагентов, выявляющих антигены, которые остаются скрытыми при использовании классических иммунологических методов, и возможно в качестве терапевтических агентов. Таким образом, другой особенностью верблюжьего нанотела, связанной с его малым размером, является способность ингибировать связывание со специфическим сайтом в бороздке или узкой расщелине белка-мишени, и поэтому их можно применять в качестве субстанции, более напоминающей по своей функции классическое низкомолекулярное лекарственное средство, чем классическое антитело.

Небольшая молекулярная масса и компактный размер обуславливают также очень высокую термостабильность, стабильность при экстремальных значениях pH и стабильность к протеолитическому расщеплению и низкую антигенность верблюжьих нанотел. Еще одним следствием указанных особенностей является то, что верблюжьи нанотела легко проникают из кровеносной системы в ткани и даже проникают через гематоэнцефалический барьер и их можно применять для лечения заболеваний, поражающих нервную ткань. Нанотела могут облегчать также транспорт лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер (см. заявку на патент США № 2004/0161738, опубликованную 19 августа 2004 г.). Эти особенности в сочетании с низкой антигенностью в отношении людей свидетельствуют об их большом терапевтическом потенциале. Кроме того, эти молекулы можно полностью экспрессировать в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, и экспрессировать в виде слитых белков с бактериофагом, и они являются функционально активными.

Таким образом, о верблюжье антитело или нанотело обладает высокой аффинностью к HER3. Верблюжье антитело или нанотело получают в естественных условиях в животном из семейства верблюдовых, т.е. оно продуцируется в организме представителя верблюдовых после иммунизации HER3 или его пептидным фрагментом с использованием методов, представленных в настоящем описании для других антител. Верблюжье связывающее HER3 нанотело можно конструировать, т.е. получать путем отбора, например, из фаговых дисплейных библиотек соответствующим образом мутированных белками верблюжьих нанотел, с помощью метода пэннинга с использованием в качестве мишени HER3, как описано в приведенных в настоящем описании примерах. Сконструированные нанотела можно дополнительно усовершенствовать с помощью генной инженерии таким образом, чтобы время их полужизни в реципиенте составляло от 45 мин до 2 недель. Верблюжье антитело или нанотело можно получать путем трансплантации последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи человеческих антител в нанотело

или в последовательности каркасных участков имеющего один домен антитела согласно методам, описанным, например в PCT/EP93/02214. Верблюжье антитело или нанотело способно связываться по меньшей мере с одним из следующих остатков HER3: Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597. Верблюжье антитело или нанотело может связываться по меньшей мере с одним из следующих остатков HER3: Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615.

Биспецифические молекулы и многовалентные антитела

Антитело или его фрагмент можно дериватизировать или связывать с другой функционально активной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора), с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антитело фактически может быть дериватизировано или связано более чем с одной другой функционально активной молекулой с образованием бипаратопных или мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; подразумевается, что в контексте настоящего описания указанные бипаратопные или мультиспецифические молекулы также подпадают под понятие "биспецифическая молекула". Для создания биспецифической молекулы антитело можно функционально связывать (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающимися молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, с получением биспецифической молекулы.

Дополнительное терапевтическое благоприятное действие можно получать путем связывания с одним антителом двух или большего количества антигенов (Coloma и др., 1997; Merchant и др., 1998; Alt и др., 1999; Zuo и др., 2000; Lu и др., 2004; Lu др., 2005; Marvin и др., 2005; Marvin и др., 2006; Shen и др., 2007; Wu и др., 2007; Dimasi и др., 2009; Michaelson и др., 2009; Morrison и др., Nature Biotech. 15, 1997, сс. 159-163; Alt и др., FEBS Letters 454, 1999, сс. 90-94; Zuo и др., Protein Engineering 13, 2000, сс. 361-367; Lu и др., JBC 279, 2004, сс. 2856-2865; Lu и др., JBC 280, 2005, сс. 19665-19672; Marvin и др., Acta Pharmacologica Sinica 26, 2005, сс. 649-658; Marvin и др., Curr Opin Drug Disc Develop 9, 2006, сс. 184-193; Shen и др., J Immun Methods 218, 2007, сс. 65-74; Wu и др., Nat Biotechnol. 11, 2007, сс. 1290-1297; Dimasi и др., J Mol Biol. 393, 2009, сс. 672-692 и Michaelson и др., mAbs 1, 2009, сс. 128-141).

Биспецифические молекулы можно получать путем конъюгации компонентов, представляющих собой обладающие способностью к связыванию специфичности, с помощью методов, известных в данной области. Например, каждую обладающую способностью к связыванию специфичность биспецифической молекулы можно создавать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать целый ряд агентов для связывания или перекрестного сшивания. Примерами перекрестносшивающих агентов являются белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB), орто-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky и др., J. Exp. Med. 160, 1984, с. 1686; Liu M.A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, с. 8648). Другие методы представляют собой методы, описанные у Paulus, Behring Ins. Mitt. No. 78, 1985, сс. 118-132; Brennan и др., Science 229, 1985, сс. 81-83) и Glennie и др., J. Immunol. 139, 1987, сс. 2367-2375). Такие предназначенные для конъюгации агенты, как SATA и сульфо-SMCC, оба поступают в продажу от фирмы Pierce Chemical Co. (Рокфорд, шт. Иллинойс).

Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой антитела, то их можно конъюгировать с помощью сульфгидрильной связи С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. Шарнирную область можно модифицировать таким образом, чтобы она до конъюгации содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, например, один.

Обе обладающие способностью к связыванию специфичности можно кодировать в одном и том же векторе и экспрессировать и собирать в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод является наиболее целесообразным, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок, такой как МАТ×МАТ, МАТ×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×Fab. Биспецифическая молекула может представлять собой одноцепочечную молекулу, которая содержит одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, которая содержит две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения биспецифических молекул описаны, например, в US № 5260203; US № 5455030; US № 4881175; US № 5132405; US № 5091513; US № 5476786; US № 5013653; US № 5258498 и US № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (РИА), FACS-анализом, биологическим анализом (например, анализом ингибирования роста) или анализом методом

вестерн-блоттинга. Каждый из указанных анализов позволяет выявлять присутствие конкретных представляющих интерес комплексов белок-антитело при использовании меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса.

Фрагменты антител можно соединять вместе путем белкового слияния или ковалентной или нековалентной связи. Четырехвалентные соединения можно получать, например, путем перекрестного сшивания антител с антителами, которые связываются с константными областями антител, например, с Fc или с шарнирной областью. Тримеризующийся домен описан, например, в патенте EP 1012280B1 на имя Borean. Пентамеризующиеся модули описаны, например, в PCT/EP97/05897.

Бипаратопные/биспецифические антитела могут связываться с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 HER3.

Индивидуальное моноклональное антитело модифицируют таким образом, чтобы антигенсвязывающие центры связывались более чем с одним антигеном, в результате чего получают двухфункциональное антитело, которое связывается как с HER3, так и с другим антигеном (например, HER1, HER2 и HER4). Мишенями двухфункционального антитела могут быть антигены, имеющие одинаковую конформацию, например, антиген, который имеет такую же конформацию, что и HER3 в "закрытом" или "неактивном" состоянии. Примерами антигенов с такой же конформацией, что и HER3 в "закрытом" или "неактивном" состоянии, являются (но, не ограничиваясь только ими) HER1 и HER4. Такое двухфункциональное антитело может связываться и с HER3, и с HER1; и с HER3, и с HER4, или с HER1 и HER4. Двойная специфичность связывания двухфункционального антитела может приводить также в двум видам активности или ингибирующей активности (см., например, Jenny Bostrom и др., Science: 323, 2009, сс. 1610-1614).

Антитела с удлинением времени полужизни

На время полужизни белка *in vivo* могут оказывать влияние многие факторы. Например, почечная фильтрация, метаболизм в печени, расщепление протеолитическими ферментами (протеазами) и иммунные ответы (например, нейтрализация белков антителами и поглощение макрофагами и дендритными клетками). Для удлинения времени полужизни антител можно применять различные стратегии. Например, это можно осуществлять с помощью химической связи с полиэтиленгликолем (ПЭГ), ReCODE-ПЭГ, с использованием каркасов антител, полисиаловой кислоты (ПСК), гидроксипропилкрахмала (ГЭК), связывающих альбумин лигандов и углеводных покрытий; путем генетического слияния с белками, связывающими сывороточные белки, такие как альбумин, IgG, FcRn, и их переноса; путем сшивания (генетического или химического) с другими связывающими фрагментами, которые связываются с сывороточными белками, такими как нанотела, Fab-фрагменты, DARPIn, авимеры, молекулы фирмы Affibody и антикаины; путем генетического слияния с рПЭГ, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающими белками и Fc; или путем включения в наноносители, препаративные формы с медленным высвобождением или медицинские устройства.

Для удлинения времени циркуляции антител в сыворотке *in vivo* инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный ПЭГ, можно присоединять к антителам или их фрагментам с помощью многофункционального линкера или без него либо посредством сайтспецифической конъюгации ПЭГ с N- или C-концом антител, либо через эpsilon-аминогруппы, присутствующие на остатках лизина. Для пэгирования антитела, как правило, антитело или его фрагмент подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, при которых одна или несколько ПЭГ-групп присоединяется(ются) к антителу или фрагменту антитела. Пэгирование можно осуществлять с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "полиэтиленгликоль" относится к любым формам ПЭГ, которые используют для дериватизации других белков, таким как моно(C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеимид. Антитело, подлежащее пэгированию, представляет собой агликолизированное антитело. Можно применять дериватизацию с помощью линейных или разветвленных полимеров, которая приводит к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгирования можно постоянно определять с помощью ДСН-ПААГ и масс-спектрометрии для гарантии правильной конъюгации молекул ПЭГ с антителами. Непрореагировавший ПЭГ можно отделять от конъюгатов антитело-ПЭГ путем гель-фильтрации или ионообменной хроматографии. Дериватизированные с помощью ПЭГ антитела можно оценивать в отношении связывающей активности, а также эффективности *in vivo*, с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области, например с помощью представленных в настоящем описании иммуноанализов. Методы пэгирования белков известны в данной области, и их можно применять к антителам, предлагаемому в изобретении (см., например, EP 0154316 на имя Nishimura с соавторами и EP 0401384 на имя Ishikawa с соавторами).

Другие модифицированные технологии пэгирования включают восстанавливающую технологию конструирования, направленную на создание химических ортогональных связей (ReCODE-ПЭГ), которая позволяет включать специфические с химической точки зрения боковые цепи в получаемые биосинтезом белки с помощью восстанавливающей системы, которая включает тРНК-синтазу и тРНК. Эта техноло-

гия позволяет включать более 30 новых аминокислот в белки, получаемые биосинтезом в клетках *E.coli*, дрожжей и млекопитающих. тРНК включает не встречающуюся в естественных условиях аминокислоту в любое место в амбер-кодоне, превращая амбер-кодон из стоп-кодона в кодон, обеспечивающий включение специфической с химической точки зрения аминокислоты.

Для удлинения времени полужизни в сыворотке можно применять также технологию, основанную на применении рекомбинантного пэгилирования (рПЭГ). Эта технология включает генетическое слияние состоящего из 300-600 аминокислот неструктурированного белкового "хвоста" с существующим фармацевтическим белком. Поскольку кажущаяся молекулярная масса такой неструктурированной белковой цепи примерно в 15 раз выше, чем его фактическая молекулярная масса, время полужизни белка в сыворотке значительно возрастает. В отличие от традиционного пэгилирования, для которого требуется химическая конъюгация и повторная очистка, процесс производства значительно упрощается и продукт является гомогенным.

Полисиалирование представляет собой другую технологию, в которой применяют встречающуюся в естественных условиях полимерную полисиаловую кислоту (ПСК) для пролонгирования времени активной жизни и повышения стабильности терапевтических пептидов и белков. ПСК представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При ее применении для введения лекарственных средств в виде белка и терапевтического пептида полисиаловая кислота обеспечивает защитное микроокружение при конъюгации. Это повышает продолжительность активной жизни терапевтического белка в кровотоке и препятствует его распознаванию иммунной системой. Полимер ПСК встречается в естественных условиях в организме человека. Он адаптирован некоторыми видами бактерий, у которых в результате эволюции в течение миллионов лет развилась способность использовать его в покрытии их оболочки. Эти встречающиеся в естественных условиях полисиалированные бактерии в результате обладают способностью благодаря молекулярной мимикрии "обойти" защитную систему организма. ПСК, являющуюся естественным компонентом разработанной stealth-технологии (технология создания "невидимки"), можно легко получать из указанных бактерий в больших количествах и с предварительно определенными физическими характеристиками. Бактериальная ПСК является совершенно неиммуногенной даже при сшивании с белками, поскольку она химически идентична ПСК, присутствующей в человеческом организме.

Другая технология основана на применении производных гидроксипропилкрахмала ("ГЭК"), связанных с антителами. ГЭК представляет собой модифицированный природный полимер, полученный из воскообразного кукурузного крахмала, и он может метаболизироваться ферментами организма. Растворы ГЭК, как правило, вводят для замещения дефицита объема крови и для улучшения реологических свойств крови. ГЭКирование антител может пролонгировать время полужизни в кровотоке путем повышения стабильности молекулы, а также в результате снижения почечного клиренса, что приводит к повышению биологической активности. Изменяя различные параметры, такие как молекулярная масса ГЭК, можно создавать широкое разнообразие конъюгатов ГЭК-антитело.

Антитела с удлиненным временем полужизни *in vivo* можно создавать также путем интродукции одной или нескольких аминокислотных модификаций (т.е. замен, инсерций или делеций) в константную область IgG или в его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнирной области Fc) (см. международную публикацию WO 98/23289; международную публикацию WO 97/34631 и US № 6277375).

Кроме того, антитела можно конъюгировать с альбумином для повышения стабильности антитела или фрагмента антитела *in vivo* или для удлинения их времени полужизни *in vivo*. Методы хорошо известны в данной области (см., например, международные публикации WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137; и европейский патент EP 413622).

Антитело к HER3 или его фрагмент можно сливать также с одним или несколькими полипептидами человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) или их фрагментами. ЧСА представляет собой белок, состоящий в зрелой форме из 585 аминокислот, он ответствен в большей степени за осмотическое давление сыворотки, а также функционирует в качестве носителя эндогенных и экзогенных лигандов. Роль альбумина в качестве молекулы-носителя и его инертная природа являются благоприятными свойствами с позиций его применения в качестве носителя и транспортера полипептидов *in vivo*. Применение альбумина как компонента слияния альбумин-белок в качестве носителя для различных белков предложено в WO 93/15199, WO 93/15200 и EP 413 622. Предложено также применение N-концевых фрагментов ЧСА для слияния с полипептидами (EP 399666). Таким образом, путем генетического или химического слияния или конъюгации антител или их фрагментов с альбумином можно стабилизировать или удлинить продолжительность жизни и/или сохранять активность молекулы в течение более длительных периодов в растворе, *in vitro* и/или *in vivo*.

Для слияния альбумина с другим белком можно применять генетические манипуляции, такие как слияние ДНК, кодирующей ЧСА, или ее фрагмента с ДНК, кодирующей белок. Затем приемлемого хозяина трансформируют или трансфектируют слитыми нуклеотидными последовательностями, располагая их на приемлемой плазмиде таким образом, чтобы экспрессировать слитый полипептид. Экспрессию можно осуществлять *in vitro*, например, с использованием прокариотических или эукариотических клеток, или *in vivo*, например, с использованием трансгенного организма. Дополнительные методы, пригод-

ные для осуществления слияниями с ЧСА, представлены, например, в WO 2001077137 и WO 200306007, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Экспрессию слитого белка осуществляют в линиях клеток млекопитающих, например линиях CHO-клеток. Можно также изменять дифференциальное связывание антитела с рецептором при низких или высоких значениях pH. Например, аффинность антитела можно модифицировать таким образом, чтобы сохранялось его связывание с рецептором при низких значениях pH, например при значениях pH, характерных для лизосом, путем модификации антитела, предусматривающей включение дополнительных аминокислот, таких как гистидин, в CDR антитела (см., например, Tomoyuki Igawa и др., *Nature Biotechnology*; 28, 2010, сс. 1203-1207).

Конъюгаты антител

Антителам или их фрагменты могут специфически связываться с белком HER3, рекомбинантно слитым или химически конъюгированным (включая как ковалентные, так и нековалентные конъюгации), с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно с полипептидом, состоящим по меньшей мере из 10, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 30, по меньшей мере из 40, по меньшей мере из 50, по меньшей мере из 60, по меньшей мере из 70, по меньшей мере из 80, по меньшей мере из 90 или по меньшей мере из 100 аминокислот), в результате чего образуются слитые белки. Слитые белки могут содержать фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, VH-область, CDR VH-области, VL-область или CDR VL-области) и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Методы слияния или конъюгирования белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны в данной области (см., например, US №№ 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851 и 5112946; европейские патенты EP 307434 и EP 367166; международные публикации WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, сс. 10535-10539; Zheng и др., *J. Immunol.* 154, 1995, сс. 5590-5600; и Vil и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 11337-11341).

С помощью методов перестановки генов, перестановки мотивов, перестановки экзонов и/или перестановки кодонов (которые вместе обозначены как "перестановка ДНК") можно создавать дополнительные слитые белки. Перестановку ДНК можно осуществлять для изменения активности антител или их фрагментов (например, антител или их фрагментов, обладающих более высокими аффинностями и более низкими скоростями диссоциации) (см. общее описание в US № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, и 5837458; Patten и др., *Cur. Opin. Biotechnol.* 8, 1997, сс. 724-733; Narayana, *Trends Biotechnol.* 16(2), 1998, сс. 76-82; Hansson и др., *J. Mol. Biol.* 287, 1999, сс. 265-276; и Lorenzo и Blasco, *Biotechniques* 24(2), 1998, сс. 308-313 (все указанные патенты и публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки)). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять, подвергая их перед рекомбинацией неспецифическому мутагенезу с помощью ПЦП пониженной точности, неспецифической инсерции нуклеотидов или обработке другими методами перед осуществлением рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которое/который специфически связывается с белком HER3, можно объединять путем рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, сегментами, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или нескольких гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела или их фрагменты можно сливать с маркерными последовательностями, такими как пептид, предназначенный для облегчения очистки. Маркерная аминокислотная последовательность может представлять собой, среди прочего, гекса-гистидиновый пептид, такой как метка, которая присутствует в векторе pQE (фирма QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсуорт, шт. Калифорния, 91311), многие такие метки поступают в продажу. Как описано у Gentz и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 821-824, например, гекса-гистидин удобно применять для очистки слитого белка. Другими пептидными метками, которые можно применять для очистки, могут служить (но, не ограничиваясь только ими) гемагглютининовая ("HA") метка, которая соответствует эпитопу, выведенному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson и др., *Cell* 37, 1984, с. 767), и "flag"-метка.

Антитела или их фрагменты можно конъюгировать с диагностическим или выявляемым агентом. Указанные антитела можно применять для мониторинга или прогнозирования возникновения, развития, прогрессирования и/или серьезности заболевания или нарушения в качестве части процедуры клинической оценки, такой как определение эффективности конкретной терапии. Такие диагностирование и выявление можно осуществлять путем сшивания антитела с выявляемыми субстанциями, такими как (но, не ограничиваясь только ими) различные ферменты, такие как (но, не ограничиваясь только ими) пероксидаза из хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) люминол; биолюминесцентные материалы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) люцифераза, люцеферин и эзкворин; радиоактивные материалы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) йод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I и ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In и ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho,

^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn и ^{117}Tl ; и испускающие позитроны металлы с применением различных вариантов позитронно-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов.

Антитело или его фрагмент можно конъюгировать с обладающим терапевтической активностью фрагментом, таким как цитотоксин, например, цитостатический или цитоцидный агент, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла, например, с эмиттерами альфа-излучения. Цитотоксин или цитотоксическое средство может представлять собой любое средство, вызывающее гибель клеток.

Кроме того, антитело или его фрагмент можно конъюгировать с обладающим терапевтической активностью фрагментом или фрагментом лекарственного средства, который модифицирует данный биологический ответ. Обладающие терапевтической активностью фрагменты или фрагменты лекарственного средства не ограничены классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающий требуемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas*, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, тканевой активатор плазминогена, проапоптозный агент, антиангиогенный агент; или модификатор биологического ответа, такой, например, как лимфокин.

Антитело к HER3 или его фрагмент можно конъюгировать с обладающим терапевтическим действием фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты обозначены в контексте настоящего описания как "иммуноконъюгаты". Иммуноконъюгаты, которые содержат один или несколько цитотоксинов, обозначают как "иммунотоксины". К цитотоксинам или цитотоксическим агентам относится любой агент, который повреждает (например, уничтожает) клетки. Их примерами являются таксон, цитохаласин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, t. колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства представляют собой, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), разрушающие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, миефалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфан, дибромманит, стрептозотоцин, митомицин С и цисдихлордиамин платины(II) (DDP), цисплатин, антрациклины (например, даунорубин (прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин) (см., например, US № 20090304721 на имя фирмы Seattle Genetics).

Другими примерами терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом являются дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауристатины и их производные. Например, в продаже имеется конъюгат антитела с калихеамицином (MylotargTM; фирма Wyeth-Ayerst).

Цитотоксины можно конъюгировать с антителами с использованием известной в данной области технологии, предусматривающей применение линкеров. Примерами типов линкеров, которые можно использовать для конъюгации цитотоксина с антителом, являются (но, не ограничиваясь только ими) гидразоны, сложные тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Можно выбирать линкер, который, например, чувствителен к расщеплению при низком значении pH в компартменте лизосомы или чувствителен к расщеплению протеазами, например протеазами, которые преимущественно экспрессируются в опухолевых тканях, такими как катепсины (например, катепсины В, С, D).

Дополнительные данные о типах цитотоксинов, линкерах и методах конъюгации терапевтических агентов и антител приведены также у Saito и др., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 2003, сс. 199-215; Trai и др., *Cancer Immunol. Immunother.* 52 2003, сс. 328-337; Payne, *Cancer Cell* 3, 2003, сс. 207-212; Allen, *Nat. Rev. Cancer* 2, 2002, сс. 750-763; Pastan и Kreitman, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3, 2002, сс. 1089-1091; Senter и Springer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 2001, сс. 247-264.

Антитела можно конъюгировать также с радиоактивными изотопами с получением цитотоксических радиоактивных фармацевтических агентов, которые называют также радиоиммуноконъюгатами. Примерами радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностических или терапевтических целях, являются (но, не ограничиваясь только ими) йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. В данной области разработаны методы получения радиоиммуноконъюгатов. Примерами имеющихся на рынке радиоиммуноконъюгатов являются ZevalinTM (фирма DEC Pharmaceuticals) и ВеххарTM (фирма Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные методы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов антител. Макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (ДОТА), которую можно присоединять к антителу через линкерную молекулу. Указанные линкерные молекулы хорошо известны в данной области и описаны у Denardo и др., *Clin Cancer Res.* 4(10), 1998, сс. 2483-2490; Peterson и др., *Bioconjug. Chem.* 10(4), 1999, сс. 553-557; и Zimmerman и др., *Nucl. Med. Biol.* 26(8), 1999, сс. 943-950, каждая публикация

полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Методы конъюгирования обладающих терапевтической активностью фрагментов с антителами хорошо известны (см., например, Amon и др., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, под ред. Reisfeld и др., изд-во Alan R. Liss, Inc., сс. 243-56, 1985; Hellstrom и др., "Antibodies For Drug Delivery", в: Controlled Drug Delivery (2-е изд.), под ред. Robinson и др., под ред. Marcel Dekker, Inc., сс. 623-53, 1987; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, под ред. Pinchera и др., 1985, сс. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, под ред. Baldwin и др., изд-во Academic Press, 1985, сс. 303-316 и Thorpe и др., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62, 1982, сс. 119-158).

Антитела можно связывать с твердыми подложками, которые можно применять, в частности, для иммуноанализов или очистки антигена-мишени.

Такие твердые подложки включают (но, не ограничиваясь только ими) стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Комбинации антител

Антитела к HER3 или их фрагменты можно применять с другими терапевтическими средствами, такими как другие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, ингибиторы mTOR или ингибиторы PI3-киназы.

Их примерами являются (но, не ограничиваясь только ими):

Ингибиторы HER1: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами HER1, включая (но, не ограничиваясь только ими) матузумаб (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаб (фирма Imclone), Vectibix®/панитумумаб (фирма Amgen), mAb 806 и нимотузумаб (фирма TheraCIM), Iressa®/гефитиниб (фирма Astrazeneca); CI-1033 (PD183805) (фирма Pfizer), лапатиниб (GW-572016) (фирма GlaxoSmithKline), Tykerb®/лапатиниба дитозилат (фирма SmithKlineBeecham), Tarceva®/эрлотиниб HCl (OSI-774) (фирма OSI Pharma) и PKI-166 (фирма Novartis) и N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[[3"S"]-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид, который поступает в продажу товарным знаком Tovok® фирмы Boehringer Ingelheim);

Ингибиторы HER2: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами HER2, включая (но, не ограничиваясь только ими) пертузумаб (поступает в продажу товарным знаком Omnitarg® фирмы Genentech), трастузумаб (поступает в продажу товарным знаком Herceptin® фирмы Genentech/Roche), MM-111, нератиниб (известен также как НКI-272, (2E)-N-[4-[[3-хлор-4-[(пиридин-2-ил)метокси]фенил]амино]-3-циан-7-этоксихинолин-6-ил]-4-(диметиламино)бут-2-енамид и описан в публикации PCT WO 05/028443), лапатиниб или лапатиниба дитозилат (поступает в продажу товарным знаком Tykerb® фирмы GlaxoSmithKline);

Ингибиторы HER3: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами HER3, включая (но, не ограничиваясь только ими) MM-121, MM-111, IB4C3, 2DID12 (фирма U3 Pharma AG), AMG888 (фирма Amgen), AV-203(фирма Aveo), MEND7945A (фирма Genentech) и малые молекулы, которые ингибируют HER3;

Ингибиторы HER4: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами HER4;

Ингибиторы PI3-киназы: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами PI3-киназы, включая (но, не ограничиваясь только ими) 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (известный также как GDC 0941 и описанный в публикациях PCT WO 09/036082 и WO 09/055730), 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (известный также как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в публикации PCT WO 06/122806), BMK120 и BYL719;

Ингибиторы mTOR: антитела к HER3 или их фрагменты можно применять в сочетании с ингибиторами mTOR, включая (но, не ограничиваясь только ими) темсиролимус (поступает в продажу товарным знаком Torisel® фирмы Pfizer), ридафоролимус (прежнее название деферолимус, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.04,9]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, известный также как деферолимус, AP23573 и МК8669 (фирма Ariad Pharm.), и описанный в публикации PCT WO 03/064383), эверолимус (RAD001) (поступает в продажу товарным знаком Afinitor® фирмы Novartis). Одно или несколько терапевтических средств можно вводить либо одновременно, либо до, либо после введения HER3 или его фрагмента, предлагаемого в настоящем изобретении.

Методы получения антител, предлагаемых в изобретении

(I) Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела

Некоторые нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует варируемую область тяжелой цепи, и/или нуклеотидную последовательность, которая кодирует вари-

бельную область легкой цепи HER3. Молекулы нуклеиновых кислот могут представлять собой молекулы, которые приведены в табл. 1. Некоторые другие молекулы нуклеиновых кислот могут содержать нуклеотидные последовательности, которые практически идентичны (например, по меньшей мере на 65%, 80%, 95% или 99%) нуклеотидным последовательностям, которые представлены в табл. 1. При экспрессии с использованием соответствующих экспрессионных векторов полипептиды, кодируемые этими полинуклеотидами, обладают способностью связываться с антигеном HER3.

Изобретение относится также к полинуклеотидам, которые кодируют по меньшей мере один CDR-участок и, как правило, все три CDR-участка тяжелой или легкой цепи представленного выше HER3-связывающего антитела. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют всю или практически всю последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи представленного выше HER3-связывающего антитела. Из-за вырожденности генетического кода каждую из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина могут кодировать различные нуклеотидные последовательности.

Молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать как варибельную область, так и константную область антитела. Некоторые нуклеотидные последовательности содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность варибельной области зрелой тяжелой цепи, которая практически идентична (например, по меньшей мере на 80%, 90% или 99%) последовательности варибельной области зрелой тяжелой цепи антитела к HER3, представленного в табл. 1. Некоторые другие нуклеотидные последовательности содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность варибельной области зрелой легкой цепи, которая практически идентична (например, по меньшей мере на 80%, 90% или 99%) последовательности варибельной области зрелой легкой цепи антитела к HER3, представленного в табл. 1.

Полинуклеотидные последовательности можно получать *de novo* твердофазным синтезом ДНК или с помощью ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, описанных ниже в примерах), кодирующей HER3-связывающее антитело или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять методами, известными в данной области, такими как фосфотриэфирный метод, описанный у Narang и др., *Meth. Enzymol.* 68, 1979, с. 90; фосфодиэфирный метод, описанный у Brown и др., *Meth. Enzymol.* 68, 1979, с. 109; диэтилфосфорамидитный метод, описанный у Beaucage и др., *Tetra. Lett.* 22, 1981, с. 1859; и метод, основанный на применении твердых подложек, который описан в US № 458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществлять, например, согласно методам, описанным в: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, под ред. H.A. Erlich, изд-во Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, под ред. Innis и др., изд-во Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila и др., *Nucleic Acids Res.* 19, 1991, с. 967; и Eckert и др., *PCR Methods and Applications* 1, 1991, с. 17.

Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи HER3-связывающего антитела или их связывающие фрагменты, можно применять различные экспрессионные векторы. Для получения антител в клетках-хозяевах млекопитающих можно применять как вирусные, так и невирусные экспрессионные векторы. К невирусным векторам и системам относятся плазмиды, эписомальные векторы, как правило, с касетой экспрессии, предназначенной для экспрессии белка или РНК, и человеческие искусственные хромосомы (см., например, Harrington и др., *Nat Genet* 15, 1997, с. 345). Например, в качестве невирусных векторов, которые можно применять для экспрессии HER3-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, человека), можно использовать рThioHis A, B и C, pcDNA3. I/His, pEBVHis A, B и C (фирма Invitrogen, Сан-Диего, шт. Калифорния), MPSV-векторы и многочисленные другие векторы, известные в данной области, которые экспрессируют другие белки. Пригодными векторами являются векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, НВР-вируса Эпштейна-Барра, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV) (см. Brent и др., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 1995, с. 807; и Rosenfeld и др., *Cell* 68, 1992, с. 143).

Выбор экспрессионного вектора зависит от клетки-хозяина, предназначенной для экспрессии вектора. Как правило, экспрессионные векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с полинуклеотидами, которые кодируют цепь HER3-связывающего антитела или его фрагмент. Индуцибельный промотор применяют для того, чтобы предупреждать экспрессию встроенных последовательностей во всех случаях за исключением случая, когда имеют место индуцирующие условия. Индуцибельными промоторами являются, например, промотор арабинозы, lacZ, промотор металлотронеина или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать в неиндуцирующих условиях, при этом не требуется осуществлять сдвиг популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клеткой. Помимо промоторов для эффективной экспрессии цепи или фрагмента HER3-связывающего антитела могут требоваться или быть желательными также и другие регуляторные элементы. Эти элементы, как правило, включают иницирующий кодон ATG и примыкающий сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить путем включения энхансеров, которые соответствуют применяемой клеточной системе (см., например, Scharf и др., *Results Probl. Cell Differ.* 20, 1994, с. 125; и Bittner и др., *Meth. Enzymol.*, 153, 1987, с.

516). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV можно применять для повышения уровня экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

В экспрессионные векторы можно встраивать также секретируемую сигнальную последовательность для получения слитого белка с полипептидами, кодируемыми встроенными последовательностями HER3-связывающего антитела. Чаще встроенные последовательности HER3-связывающего антитела связывают с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, которые можно применять для получения последовательностей, кодирующих переменные области легкой и тяжелой цепи HER3-связывающего антитела, в некоторых случаях могут кодировать также константные области или их участки. Такие векторы позволяют также экспрессировать переменные области в виде слитых с константными областями белков, что позволяет тем самым продуцировать интактные антитела или их фрагменты. Как правило, указанные константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева, которые несут или экспрессируют цепи HER3-связывающего антитела, могут представлять собой либо прокариотические, либо эукариотические клетки. Микроорганизм *E. coli* является одним из прокариотических хозяев, которые применяются для клонирования и экспрессии полинуклеотидов, предлагаемых в настоящем изобретении. Другими пригодными для применения хозяевами-микроорганизмами являются бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие представители сем. *Enterobacteriaceae*, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для этих прокариотических хозяев можно создавать такие экспрессионные векторы, которые, как правило, содержат контролирующие экспрессию последовательности, совместимые с клеткой-хозяином (например, сайт инициации репликации). Кроме того, должны присутствовать любые из широкого разнообразия хорошо известных промоторов, такие как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, необязательно в сочетании с последовательностью оператора, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т.п., предназначенные для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии HER3-связывающих полипептидов можно применять также другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Можно применять также клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

Для экспрессии и получения HER3-связывающих полипептидов можно применять клетки-хозяева млекопитающих. Например, они могут представлять собой либо линию клеток гибридомы, экспрессирующей эндогенные гены иммуноглобулина (например, описанный в примерах клон гибридомы, полученный в результате слияния с миеломой, например, 1D6.C9), либо линию клеток млекопитающих, которая несет экзогенный экспрессионный вектор (например, описанные ниже в примере клетки миеломы SP2/0). Они включают любую клетку животного или человека, характеризующуюся обычной смертностью, или обычные или аномальные иммортализованные клетки. Например, разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, обладающих способностью секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии CHO-клеток, различные линии Cos-клеток, HeLa-клетки, линии клеток миелом, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение культур клеток из тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов описано в целом, например, у Winnacker, *From Genes to Clones*, изд-во VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессионные векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать контролирующие экспрессию последовательности, такие как сайт инициации репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen и др., *Immunol. Rev.* 89, 1986, сс. 49-68), необходимые для процессинга информационные сайты, такие как сайт связывания рибосомы, сайты РНК-сплайсинга, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Эти экспрессионные векторы, как правило, содержат промоторы, выведенные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Приемлемые промоторы могут быть конститутивными, специфическими для типа клеток, специфическими для стадии развития и/или могут быть модулируемыми или регулируемыми. Пригодными промоторами являются (но, не ограничиваясь только ими) промотор металлотioneина, конститутивный главный поздний промотор аденовирусов, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP *polIII*, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как человеческий немедленно-ранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области.

Методы интродукции экспрессионных векторов, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, следует выбирать в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекции с использованием хлорида кальция, как правило, применяют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно применять для других типов клеток-хозяев (см. общие положения у Sambrook и др., выше). Другие методы представляют собой, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредуемую липосомой трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические методы, применение вирусом, иммунолипосом, конъюгатов поликариона: нуклеиновая кислота, "оголенной" ДНК, искусственных вирионов, слитого с вирусом герпеса структурного белка VP22 (Elliot и O'Hare, *Cell* 88, 1997, с. 223), агента, облегчающего проникновение ДНК, и трансдукцию *ex vivo*. Для длительного производства с высоким выходом рекомбинантных белков часто является желательной стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно

экспрессируют цепи HER3-связывающего антитела или его связывающие фрагменты, можно получать, используя экспрессионные векторы, которые содержат вирусные сайты инициации репликации или эндогенные экспрессионные элементы и селективируемый маркерный ген. После интродукции вектора клеткам можно давать расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах, после чего переносить их в селективные среды. Селективируемый маркер вносят с целью придания устойчивости к фактору селекции, и его присутствие обеспечивает рост клеток, в которых происходит успешная экспрессия интродуцированных последовательностей в селективных средах. Устойчивые стабильно трансфектированные клетки можно размножать с помощью методов культивирования тканей, пригодных для конкретного типа клеток.

(II) Создание моноклональных антител, предлагаемых в изобретении

Моноклональные антитела (МАт) можно получать с помощью различных методов, включая общепринятые методы получения моноклональных антител, например, с помощью стандартного метода гибридизации соматических клеток, описанного у Kohler и Milstein, *Nature* 256, 1975, с. 495. Для получения моноклональных антител можно применять многочисленные методики, например, трансформацию В-лимфоцитов вирусами или онкогенами.

Применяемая для получения гибридом система животного происхождения представляет собой систему, основанную на использовании мышей. Создание гибридомы в мыши является хорошо известной процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов, предназначенных для слияния, известны в данной области. Известны также компоненты, участвующие в слиянии (например, клетки мышинной миеломы), и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела можно создавать на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного согласно описанному выше методу. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес мышинной гибридомы и создавать так, чтобы она содержала немышинные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулинов, с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела можно связывать мышинные варибельные области с человеческими константными областями с использованием известных в данной области методов (см., например, US № 4816567 на имя Cabilly с соавторами). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-участки можно встраивать в человеческий каркасный участок с помощью известных в данной области методов (см., например, US № 5225539 на имя Winter и US №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Антитела могут представлять собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела к HER3 можно создавать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих фрагменты человеческой, а не мышинной иммунной системы. К этим трансгенным и трансхромосомным мышам относятся мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как HuMAb-мыши и KM-мыши соответственно, и мышей обеих указанных линий обозначают в контексте настоящего описания как "мышь, несущие человеческий Ig".

Мыши линии HuMAb (HuMAb mouse®, фирма Medarex, Inc.) несут минилокусы генов человеческого иммуноглобулина, которые кодируют неперегруппированные последовательности человеческой тяжелой (μ и γ) и легкой к-цепи иммуноглобулина, в сочетании с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и к-цепи (см., например, Lonberg и др., *Nature* 368(6474), 1994, сс. 856-859). Таким образом, у мыши снижена способность экспрессировать мышинный IgM или к-цепь, и в ответ на иммунизацию интродуцированные трансгены человеческой тяжелой и легкой цепи подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием обладающего высокой аффинностью человеческого моноклонального IgGк (Lonberg и др., 1994, выше; обзорная статья Lonberg, *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 1994, сс. 49-101; Lonberg и Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 1995, сс. 65-93 и Harding и Lonberg, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764, 1995, сс. 536-546). Получение и применение мышей линии HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мыши, описаны также у Taylor и др., *Nucleic Acids Research* 20, 1992, сс. 6287-6295; Chen и др., *International Immunology* 5, 1993, сс. 647-656; Tuailon и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1993, сс. 3720-3724; Choi и др., *Nature Genetics* 4, 1993, сс. 117-123; Chen и др., *EMBO J.* 12, 1993, сс. 821-830; Tuailon и др., *J. Immunol.* 152, 1994, сс. 2912-2920; Taylor и др., *International Immunology*, 1994, сс. 579-591; и Fishwild и др., *Nature Biotechnology* 14, 1996, сс. 845-851, содержание всех публикаций специально полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки (см. также US №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429, все на имя Lonberg и Kay; US № 5545807 на имя Surani с соавторами; опубликованные заявки PCT WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и опубликованную заявку PCT WO 01/14424 на имя Kortan с соавторами).

Человеческие антитела можно получать с использованием мыши, которая несет трансгенные и трансхромосомные последовательности человеческого иммуноглобулина, например мыши, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как "KM-мышь", описаны подробно в публикации PCT WO 02/43478 на имя Ishida с соавторами.

В данной области известны также и другие альтернативные системы на основе трансгенных животных, экспрессирующих гены человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения HER3-связывающих антител. Например, можно использовать другую трансгенную систему, обозначенную как Xenomouse (фирма Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в US №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 на имя Kucherlapati с соавторами.

Кроме того, в данной области известны также другие трансхромосомные системы, созданные на основе животных, для экспрессии генов человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения HER3-связывающих антител. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так и трансхромосому человеческой легкой цепи, которые обозначены как "ТС-мыши"; такие мыши описаны, например, у Tomizuka и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, сс. 722-727. Кроме того, в данной области известны коровы, несущие трансхромосомы человеческой тяжелой и легкой цепи (Kuroiwa и др., Nature Biotechnology 20, 2002, сс. 889-894), и их можно применять для получения HER3-связывающих антител. Человеческие моноклональные антитела можно получать также с использованием методов фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобулинов. Такие методы фагового дисплея, предназначенные для выделения человеческих антител, известны в данной области (см., например, US №№ 5223409; 5403484 и 5571698 на имя Ladner с соавторами, US №№ 5427908 и 5580717 на имя Dower с соавторами, US №№ 5969108 и 6172197 на имя McCafferty с соавторами, и US №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 на имя Griffiths с соавторами) или они описаны в приведенных ниже примерах.

Человеческие моноклональные антитела можно получать также с использованием SCID-мышей (мышь с тяжелым комбинированным иммунодефицитом), в которых восстанавливали человеческие иммунные клетки с тем, чтобы при иммунизации можно было получать человеческий гуморальный иммунный ответ. Такие мыши описаны, например, в № US 5476996 и 5698767 на имя Wilson с соавторами.

(III) Конструирование каркасных участков или Fc

К сконструированным антителам относятся антитела, в которых сделаны модификации в остатках каркасных участков в VH и/или VL, например, с целью улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасных участков осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов представляет собой "обратное мутирование" одного или нескольких остатков каркасного участка с получением соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать остатки каркасного участка, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой выведено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркасных участков антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой выведено антитело. Для возвращения последовательностей каркасного участка к исходной конфигурации зародышевой линии можно подвергать соматические мутации "обратному мутированию" с получением последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза. Такие антитела, полученные путем "обратного мутирования", также подпадают под объем настоящего изобретения.

Другой тип модификации каркасного участка включает изменение путем мутации одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в одном или нескольких CDR-участках для удаления T-клеточных эпитопов с целью снижения потенциальной иммуногенности антитела. Этот подход обозначают также как "деиммунизация", и он описан более подробно в опубликованном патенте US № 2003/0153043 на имя Saig с соавторами.

В дополнительном или альтернативном варианте помимо модификаций в каркасных участках или CDR-участках антитела могут включать модификации в Fc-фрагменте, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность. Кроме того, антитело можно модифицировать химически (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических фрагментов) или можно модифицировать для изменения его гликозилирования, и в этом случае с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Нумерация остатков в Fc-фрагменте соответствует нумерации EU по Кэботу.

Шарнирную область СН1 можно модифицировать так, чтобы изменять, например увеличивать или снижать, количество цистеиновых остатков в шарнирной области. Этот подход описан также в US № 5677425 на имя Vodmer с соавторами. Количество цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

Шарнирную область Fc-фрагмента антитела также можно изменять с помощью мутации для уменьшения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, интродуцируют одну или несколько аминокислотных мутаций в область контакта СН2-СН3-доменов шарнирной области Fc-фрагмента для ухудшения связывания антитела с белком А золотистого стафилококка Staphylococcus (SpA) по сравнению со связыванием нативной шарнирной области Fc-фрагмента с SpA. Этот подход описан более подробно в US № 6165745 на имя Ward с соавторами.

Fc-фрагмент можно изменять путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на

другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, один или несколько аминокислотных остатков можно заменять на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы у такого антитела изменялась аффинность к эффекторному лиганду, но сохранялась антигенсвязывающая способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент системы комплемента. Этот подход описан более подробно в US № 5624821 и 5648260, оба на имя Winter с соавторами.

Один или несколько аминокислотных остатков аминокислотной последовательности можно заменять другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело имело измененную способность к C1q-связыванию и/или пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или чтобы у него отсутствовала CDC. Этот подход описан более подробно в US № 6194551 на имя Idusogie с соавторами.

Один или несколько аминокислотных остатков можно также модифицировать, изменяя тем самым способность антитела к фиксации комплемента. Этот подход описан также в публикации заявки PCT WO 94/29351 на имя Vodmer с соавторами.

Fc-фрагмент можно модифицировать для повышения способности антитела вызывать антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход описан более подробно в публикации заявки PCT WO 00/42072 на имя Presta. Кроме того, были картированы сайты связывания человеческого IgGγ с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенной способностью к связыванию (см. Shields и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604).

Существует возможность модифицировать гликозилирование антитела. Например, можно создавать агликозилированное антитело (т.е. антитело, в котором отсутствует гликозилирование). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к "антигену". Такие углеводные модификации можно осуществлять путем, например, изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка варибельной области, устраняя тем самым гликозилирование в этом сайте. Указанное агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Этот подход описан более подробно в US № 5714350 и 6350861 на имя Co с соавторами.

В дополнительном или альтернативном варианте можно создавать антитело с измененным типом гликозилирования, например гипофукозилированное антитело, которое имеет пониженное количество фукозильных остатков, или антитело с повышенным содержанием двурассекающих GlcNac-структур. Было продемонстрировано, что такие измененные схемы гликозилирования повышают ADCC-активность антител. Указанные углеводные модификации можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования известны в данной области, и их можно применять в качестве клеточных хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела для получения тем самым антител с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 на имя Hang с соавторами описана линия клеток с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, в результате чего экспрессируемые в такой клеточной линии антитела характеризуются гипофукозилированием. В публикации заявки PCT WO 03/035835 на имя Presta описан вариант линии CHO-клеток, а именно LecI3-клетки, которые характеризуются пониженной способностью присоединять фукозу к связанным с Asn(297) углеводам, что приводит также к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields и др., J. Biol. Chem. 277, 2002, сс. 26733-26740). В публикации заявки PCT WO 99/54342 на имя Umana с соавторами, описаны линии клеток, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), в результате чего антитела, которые экспрессируются в сконструированных линиях клеток, характеризуются повышенным содержанием двурассекающих GlcNac-структур, что приводит к повышенной ADCC-активности антител (см. также Umana и др., Nat. Biotech. 17, 1999, сс. 176-180).

Антитело можно модифицировать для удлинения биологического времени полужизни. При этом возможно применение различных подходов. Например, можно интродуцировать одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, описанных в US № 6277375 на имя Ward. В другом варианте для удлинения биологического времени полужизни можно изменять антитело в CH1-или CL-области путем интродукции связывающегося с рецептором-"спасателем" эпитопа, полученного из двух петель CH2-домена Fc-фрагмента IgG, как описано в US №№ 5869046 и US 6121022 на имя Presta с соавторами.

(IV) Методы конструирования измененных антител

Как указано выше, HER3-связывающие антитела, которые имеют последовательности VH и VL или последовательности полноразмерной тяжелой и легкой цепи можно применять для создания новых HER3-связывающих антител путем модификации последовательностей полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательностей VH и/или VL или присоединенной(ых) к ним константной(ых) области(ей). Таким образом, структурные особенности HER3-связывающего антитела используют для

создания структурно родственных HER3-связывающих антител, которые сохраняют по меньшей мере одно из функциональных свойств основных антител, таких как связывание с человеческим HER3, а также способность ингибировать одно или несколько функциональных свойств HER3. Например, один или несколько CDR-участков антител или их мутантов можно объединять рекомбинантно с известными каркасными участками и/или другими CDR для получения дополнительных, созданных с использованием рекомбинантной ДНК HER3-связывающих антител. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для конструирования является одна или несколько последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или один или несколько их CDR-участков. Для создания сконструированного антитела не является необходимым фактическое получение (т.е. экспрессия в виде белка) антитела, которое имеет одну или несколько из последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или один или несколько их CDR-участков. Предпочтительно информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", выведенной(ых) из исходной(ых) последовательности(ей), и затем получают последовательность(и) второго поколения и экспрессируют в виде белка.

Таким образом, можно получать HER3-связывающее антитело, состоящее из: последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела, которая содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 8, 20, 26, 38, 44, 56, 62, 74, 80, 92, 98, 110, 116, 128, 134, 146, 152, 164, 170, 182, 188, 200, 206, 218, 224, 236, 242, 254, 260, 272, 278, 290, 296, 308, 314, 326, 332, 344, 350, 362 и 368; последовательность CDR2, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 9, 21, 27, 39, 45, 57, 63, 75, 81, 93, 99, 111, 117, 129, 135, 147, 153, 165, 171, 183, 189, 201, 207, 219, 225, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369; и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 4, 10, 22, 28, 40, 46, 58, 64, 75, 82, 94, 100, 112, 118, 130, 136, 148, 154, 166, 172, 184, 190, 202, 208, 220, 226, 238, 244, 256, 262, 274, 280, 292, 298, 310, 316, 328, 334, 346, 352, 364 и 370; и последовательности варибельной области легкой цепи антитела, которая содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 5, 11, 23, 29, 41, 47, 59, 65, 77, 83, 95, 101, 113, 119, 131, 137, 149, 155, 167, 173, 185, 191, 203, 209, 221, 227, 239, 245, 257, 263, 275, 281, 293, 299, 311, 317, 329, 335, 347, 353, 365 и 371; последовательность CDR2, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 6, 12, 24, 30, 42, 48, 60, 66, 78, 84, 96, 102, 114, 120, 132, 138, 150, 156, 168, 174, 186, 192, 204, 210, 222, 228, 240, 246, 258, 264, 276, 282, 294, 300, 312, 318, 330, 336, 348, 354, 366 и 372; и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 7, 13, 25, 31, 43, 49, 61, 67, 79, 85, 97, 103, 115, 121, 133, 139, 151, 157, 169, 175, 187, 193, 205, 211, 223, 229, 241, 247, 259, 265, 277, 283, 295, 301, 313, 319, 331, 337, 349, 355, 367 и 373; для этого изменяют по меньшей мере один аминокислотный остаток в последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела и/или варибельной области легкой цепи антитела, создавая по меньшей мере одну измененную последовательность антитела, и экспрессируют измененную последовательность антитела в виде белка. Измененную последовательность антитела можно создавать также путем скрининга библиотек антител, которые имеют фиксированные последовательности CDR3 или минимальные имеющие решающее значение связывающие детерминанты, описанные в US № 20050255552, и разнообразные последовательности CDR1 и CDR2. Скрининг можно осуществлять с использованием любого метода скрининга, пригодного для скрининга антител из библиотек антител, такого как технология фагового дисплея.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Антитело, кодируемое измененной(ыми) последовательность(ями), представляет собой антитело, которое сохраняет одну, несколько или все функциональные свойства HER3-связывающих антител, представленных в настоящем описании, где функциональные свойства представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) специфическое связывание с HER3 человека и/или обезьяны циномоглус; при этом антитело связывается с HER3 и нейтрализует биологическую активность HER3 путем ингибирования сигнальной активности HER по данным анализа фосфо-HER.

Функциональные свойства измененных антител можно оценивать с помощью стандартных анализов, известных в данной области и/или представленных в настоящем описании, таких как описанные в разделе "Примеры" (например, ELISA).

Мутации можно интродуцировать произвольно или избирательно во всю или в часть кодирующей последовательности HER3-связывающего антитела и полученные в результате модифицированные HER3-связывающие антитела можно подвергать скринингу в отношении связывающей активности и/или других описанных выше функциональных свойств. Методы интродукции мутаций известны в данной области. Например, в публикации заявки PCT WO 02/092780 на имя Short описаны методы создания и скрининга мутаций антител с помощью насыщающего мутагенеза, синтетической сборки лигированием или с помощью комбинации этих методов. Альтернативно этому в опубликованной заявке PCT WO 03/074679 на имя Lazar с соавторами описаны методы, основанные на компьютерном скрининге, для оптимизации физико-химических свойств антител.

Характеризация антител, предлагаемых в изобретении

Антитела можно характеризовать с помощью различных функциональных анализов. Например, их можно характеризовать по их способности нейтрализовать биологическую активность путем ингибирования передачи сигнала HER на основе анализа фосфо-HER, который представлен в настоящем описании, по их аффинности к белку HER3 (например, HER3 человека и/или обезьяны циномоглус), по эпиглопной группировке, по их устойчивости к протеолизу и по их способности блокировать передачу сигнала HER3 в прямом направлении. Различные методы можно применять для оценки опосредуемой HER3 передачи сигнала. Например, путь передачи сигнала HER можно определять путем (I) оценки фосфо-HER3; (II) оценки фосфорилирования HER3 или других белков, расположенных в пути передачи сигнала (например, Akt), (III) с помощью анализов блокады лигандов, которые представлены в настоящем описании, (IV) по образованию гетеродимеров, (V) по схеме HER3-зависимой экспрессии генов, (VI) по интернализации рецептора и (VII) по определяемым HER3 клеточным фенотипам (например, по пролиферации).

Способность антитела связываться с HER3 можно выявлять путем непосредственного мечения представляющего интерес антитела, или антитело может находиться в немеченой форме, а связывание можно выявлять косвенными методами, используя форматы сэндвич-анализов, которые известны в данной области.

HER3-связывающие антитела блокируют связывание или конкурируют за связывание полипептида или белка HER3 с референс-антителом, связывающимся с HER3. Они могут представлять собой полностью человеческие HER3-связывающие антитела, описанные выше. Они могут представлять собой также другие мышинные, химерные или гуманизированные HER3-связывающие антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и референс-антитело. Способность блокировать связывание референс-антитела с эпитопом или конкурировать за связывание с референс-антителом свидетельствует о том, что тестируемое HER3-связывающее антитело связывается с тем же или подобным эпитопом, который распознается референс-антителом, или с эпитопом, который расположен в достаточной близости от эпитопа, с которым связывается референс-антитело, связывающееся с HER3. Указанные антитела с большой долей вероятности будут обладать преимуществами, выявленными у референс-антитела. Способность блокировать связывание или конкурировать с референс-антителом можно определять, например, с помощью анализа конкурентного связывания. При осуществлении анализа конкурентного связывания определяют способность тестируемого антитела ингибировать специфическое связывание референс-антитела с общим антигеном, таким как полипептид или белок HER3. Тестируемое антитело конкурирует с референс-антителом за специфическое связывание с антигеном, если при применении в избыточном количестве тестируемое антитело в значительной степени ингибирует связывание референс-антитела. Понятие "в значительной степени ингибирует" означает, что тестируемое антитело снижает связывание референс-антитела, как правило, по меньшей мере на 10%, 25%, 50%, 75% или 90%.

Известно несколько конкурентных анализов связывания, которые можно применять для оценки конкуренции HER3-связывающего антитела и референс-антитела, связывающегося с HER3, за связывание с белком HER3. К ним относятся, например, твердофазный прямой или косвенный радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или косвенный иммуоферментный анализ (ИФА), конкурентный "сэндвич"-анализ (см. Stahl и др., *Methods in Enzymology* 9, 1983, сс. 242-253); твердофазный прямой ИФА с использованием биотина-авидина (см. Kirkland и др., *J. Immunol.* 137, 1986, сс. 3614-3619); твердофазный прямой анализ с использованием метки, твердофазный прямой "сэндвич"-анализ с использованием метки (см. Harlow и Lane, выше); твердофазный прямой РИА с использованием в качестве метки I^{125} (см. Morel и др., *Molec. Immunol.* 25, 1988, сс. 7-15); твердофазный прямой ИФА с использованием биотина и авидина (Cheung и др., *Virology* 176, 1990, сс. 546-552); и прямой РИА с использованием метки (Moldenhauer и др., *Scand. J. Immunol.* 32, 1990, сс. 77-82). Как правило, такой анализ предусматривает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любые из них, немеченого тестируемого HER3-связывающего антитела и меченого референс-антитела. Конкурентное ингибирование оценивают, определяя количество метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии тестируемого антитела. Как правило, тестируемое антитело применяют в избыточном количестве. К антителам, идентифицированным с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), относятся антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и референс-антитело, и антитела, которые связываются с соседним эпитопом, расположенным в достаточной близости от эпитопа, с которым связывается референс-антитело, чтобы это создавало стерическую помеху.

Для решения вопроса о том, связываются ли отобранные моноклональные HER3-связывающие антитела с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием поступающих в продажу реагентов (например, реагентов фирмы Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс). Анализы конкурентного связывания с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно осуществлять, применяя сенсбилизированные полипептидом HER3 планшеты для ELISA. Связывание биотинилированного МАt можно выявлять с помощью зонда стрептавидин-щелочная фосфатаза. Для определения изотипа очищенного HER3-связывающего антитела можно применять специфические для изотипа ELISA. Например, лунки титрационных планшетов можно сенси-

билизировать с использованием взятого в концентрации 1 мкг/мл антитела к человеческому IgG в течение ночи при 4°C. После блокирования с помощью 1% БСА содержимое планшетов подвергают взаимодействию с моноклональным HER3-связывающим антителом или с очищенными применяемыми для контроля изотипа антителами в концентрации 1 мкг/мл или менее в течение 1-2 ч при температуре окружающей среды. Затем содержимое лунок можно подвергать взаимодействию с конъюгированными с щелочной фосфатазой зондами, специфическими в отношении либо человеческого IgG γ , либо человеческого IgM. Затем планшеты проявляют и подвергают анализу, с помощью которого можно определять изотип очищенного антитела.

Для демонстрации связывания моноклональных HER3-связывающих антител с живыми клетками, экспрессирующими полипептид HER3, можно применять проточную цитометрию. В целом, метод состоит в следующем: линии клеток, экспрессирующие HER3 (выращенные в стандартных условиях культивирования), можно смешивать с HER3-связывающим антителом, взятым в различных концентрациях, в ЗФР, содержащем 0,1% БСА и 10% фетальной телячьей сыворотки, и инкубировать в течение 1 ч. После отмывки клетки подвергают взаимодействию с меченым флуоресцеином антителом к человеческому IgG в таких же условиях, которые применяют для окрашивания первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью устройства типа FACScan, основанном на использовании света и свойств бокового рассеяния, устанавливая дискриминационное окно на индивидуальные клетки. В альтернативном варианте для анализа можно использовать флуоресцентный микроскоп (в дополнение к проточной цитометрии или вместо нее). Клетки можно окрашивать полностью согласно описанному выше методу и оценивать с помощью флуоресцентного микроскопа. Этот метод позволяет визуализировать индивидуальные клетки, но может обладать пониженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Реактивность HER3-связывающих антител в отношении полипептида HER3 или его антигенного фрагмента можно оценивать также с помощью вестерн-блоттинга. В целом, метод состоит в следующем: можно получать очищенные полипептиды HER3 или слитые белки, или можно приготавливать клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих HER3, и подвергать гель-электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 10% фетальной телячьей сыворотки и зондируют тестируемыми моноклональными антителами. Связывание человеческого IgG можно выявлять с помощью антитела к человеческому IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и проявлять, используя таблетки субстрата BCIP/NBT (фирма Sigma Chem. Co., Сент-Луис, шт. Миссури).

Целый ряд выходных данных можно применять для оценки эффективности и специфичности антител к HER3 с использованием анализов в клетках индуцируемого лигандом образования гетеродимера. Активность можно оценивать с помощью одного или нескольких следующих методов:

(I) Ингибирование индуцируемой лигандом гетеродимеризации HER2 с другими представителями семейства EGF в линии клетки-мишени, например линии клеток рака молочной железы MCF-7. Иммунопреципитацию комплексов с HER2 из клеточных лизатов можно осуществлять с использованием специфического для рецептора антитела, и отсутствие/присутствие других EGF-рецепторов и их биологически соответствующих лигандов в комплексе можно анализировать с помощью электрофореза/вестерн-блоттинга путем зондирования антителами к другим EGF-рецепторам.

(II) Ингибирование активации путем передачи сигнала с помощью активированных лигандом гетеродимеров. Ассоциация с HER3, вероятно, имеет решающее значение для других представителей семейства рецепторов EGF в отношении образования максимального клеточного ответа после связывания с лигандом. В случае HER3 с дефицитом киназной активности HER2 является источником функционального тирозинкиназного домена, что обеспечивает передачу сигнала после связывания с лигандами фактора роста. Таким образом, клетки, в которых происходит совместная экспрессия HER2 и HER3, можно обрабатывать лигандом, например херегулином, в отсутствие и в присутствии ингибитора, и воздействие фосфорилирования тирозина HER3 оценивать разными путями, включая иммунопреципитацию HER3 из обработанных клеточных лизатов и последующий анализ методом вестерн-блоттинга с использованием антител к фосфотирозину (см. более подробно у Agus *op. cit.*) В альтернативном варианте можно осуществлять широкомасштабный анализ, основанный на трэппинге HER3 из солибилизованных лизатов в лунках 96-луночного планшета, сенсibiliзировавшего антителом к HER3-рецептору, и оценивать фосфорилирование тирозина с использованием, например, меченных европием антител к фосфотирозину, согласно методу, описанному у Waddleton и др., *Anal. Biochem.* 309, 2002, сс. 150-157.

В более широком смысле указанных подход состоит в том, что эффекторные молекулы, которые, как известно, должны активировать в прямом направлении активированные рецепторные гетеродимеры, такие как активируемые митогеном протеинкиназы (МАРК) и Akt, можно анализировать непосредственно путем иммунопреципитации из обработанных лизатов и блоттирования с использованием антител, которые выявляют активированные формы этих белков, или путем анализа способности этих белков модифицировать/активировать специфические субстраты.

(III) Ингибирование индуцируемой лигандом клеточной пролиферации. Известно, что в целом ряде клеточных линий происходит совместная экспрессия ErbB-рецепторов, например, во многих клеточных линиях рака молочной железы и предстательной железы. Анализы можно осуществлять в 24/48/96-

луночных форматах, в которых в качестве выходных данных используют синтез ДНК (включение тритированного тимидина), увеличение количества клеток (окрашивание кристаллическим фиолетовым) и т.д.

Для оценки эффективности и специфичности антител к HER3 с использованием анализов независимого от лиганда образования гетеродимера в клетках можно применять целый ряд выходных данных. Например, сверхэкспрессия HER2 запускает независимую от лиганда активацию киназного домена в результате спонтанного образования димера. При его сверхэкспрессии HER2 создает либо гомо-, либо гетеродимеры с другими молекулами HER, такими как HER1, HER3 и HER4.

Можно оценивать способность антител или их фрагментов блокировать *in vivo* рост опухолевых ксенотрансплантатов человеческих опухолевых линий клеток, онкогенный фенотип которых, как известно, по меньшей мере частично зависит от активации лигандом клеточной передачи сигнала гетеродимером HER3, например клеток рака поджелудочной железы линии VxPC3 и т.д. Это можно оценивать на мышцах с ослабленным иммунитетом, используя антитела либо индивидуально, либо в комбинации с соответствующим цитотоксическим агентом для рассматриваемой клеточной линии. Примеры функциональных анализов представлены также ниже в разделе "Примеры". Профилактическое и терапевтическое применение Способ лечения или предупреждения рака (такого, например, как рак молочной железы, колоректальный рак, рак легкого, множественная миелома, рак яичника, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, остеосаркома, плоскоклеточная карцинома, опухоли оболочки периферических нервов, шваннома, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, эзофагеальный рак, глиобластома, светлоклеточная саркома мягкой ткани, злокачественная мезотелиома, нейрофиброматоз, рак почки и меланома) заключается в том, что индивидууму, который нуждается в этом, вводят в эффективном количестве антитела.

Способы лечения или предупреждения рака, ассоциированного с путем передачи сигнала HER, заключается в том, что индивидууму, который нуждается в этом, вводят в эффективном количестве антитела.

При этом раком, ассоциированным с путем передачи сигнала HER, является (но не ограничиваясь только ими) рак молочной железы, колоректальный рак, рак легкого, множественная миелома, рак яичника, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, остеосаркома, плоскоклеточная карцинома, опухоли оболочки периферических нервов, шваннома, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, эзофагеальный рак, глиобластома, светлоклеточная саркома мягкой ткани, злокачественная мезотелиома, нейрофиброматоз, рак почки и меланома.

Антитела к HER3 можно применять также для лечения или предупреждения других нарушений, ассоциированных с aberrантной или нарушенной передачей сигнала HER, включая (но не ограничиваясь только ими) респираторные заболевания, остеопороз, остеоартрит, поликистоз почек, диабет, шизофрению, сосудистое заболевание, болезнь сердца, неонкогенные пролиферативные болезни, фиброз и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера.

Приемлемыми средствами для комбинированной терапии с использованием HER3-связывающих антител являются стандартные лекарственные средства, известные в данной области, которые могут модулировать путь передачи сигнала ErbB. Приемлемыми примерами стандартных лекарственных средств для HER2 являются (но не ограничиваясь только ими) герцептин и тайкерб. Приемлемыми примерами стандартных лекарственных средств для EGFR являются (но не ограничиваясь только ими) иресса, тарцева, эрбитукс и вектибикс. Другими средствами, которые можно применять для комбинированной терапии с использованием HER3-связывающих антител являются (но не ограничиваясь только ими) средства, которые модулируют рецепторные тирозинкиназы, рецепторы, связанные с G-белком, пути трансдукции сигналов роста/выживания, рецепторы ядерных гормонов, пути апоптоза, клеточный цикл и ангиогенез.

Диагностическое применение

Диагностические анализы, предназначены для обнаружения белка HER3 и/или экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей HER3, а также функции белка HER3 в биологическом образце (например, в крови, сыворотке, клетках, ткани) или в организме индивидуума, пораженного раком или имеющего риск развития рака.

Диагностические анализы, такие как конкурентные анализы, основаны на способности меченого аналога ("индикатор") конкурировать с анализируемым веществом тест-образца за ограниченное количество сайтов связывания на общем партнере по связыванию. Как правило, осуществляют инсолубилизацию партнера по связыванию до или после конкурентного анализа и затем индикатор и анализируемое вещество, связанное с партнером по связыванию, отделяют от несвязанного индикатора и анализируемого вещества. Такое разделение осуществляют путем сцеживания (когда партнер по связыванию предварительно был инсолубилизован) или путем центрифугирования (когда партнер по связыванию осажден после реакции конкурентирования). Количество анализируемого вещества в тест-образце обратно пропорционально количеству связанного индикатора при оценке по количеству маркерной субстанции. Получают кривые дозовой зависимости с использованием известных количеств анализируемого вещества и сравнивают с результатами теста для количественной оценки уровня анализируемого вещества, присутствующего в тест-образце. Такие анализы называют анализами на основе ELISA-систем, когда в качестве

выявляемых маркеров используют ферменты. В анализе такого формата конкурентное связывание между антителами и HER3-связывающими антителами приводит к связыванию с белком HER3, предпочтительно эпитопами HER3, которое является мерой уровня антител в образце сыворотки, наиболее предпочтительно нейтрализующих антител в образце сыворотки.

Важным преимуществом анализа является то, что можно осуществлять непосредственное измерение титра нейтрализующих антител (т.е. антител, которые оказывают интерферирующее действие на связывание с белком HER3, в частности его эпитопами). Такой анализ, прежде всего в формате ELISA, обычно используют в клинических условиях, и он является рутинным при осуществлении скрининга образцов крови.

Можно также определять уровень экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей HER3, или активности белка HER3 у индивидуума с целью выбора соответствующих терапевтических или профилактических средств для индивидуума (обозначены в контексте настоящего описания как "фармакогеномные способы"). Фармакогеномные исследования позволяют осуществлять выбор агентов (например, лекарственных средств), предназначенных для терапевтического или профилактического лечения индивидуума, на основе генотипа индивидуума (например, генотипа индивидуума, исследованного для определения способности индивидуума реагировать на конкретный агент).

Кроме того, возможно проводить мониторинг воздействия агентов (например, лекарственных средств) на экспрессию или активность белка HER3 в клинических исследованиях.

Фармацевтические композиции

Для приготовления фармацевтических или стерильных композиций, содержащих HER3-связывающие антитела (интактные или связывающие фрагменты), HER3-связывающие антитела (интактные или связывающие фрагменты) смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиции могут дополнительно содержать одно или несколько других терапевтических средств, которые можно применять для лечения или предупреждения рака (рак молочной железы, колоректальный рак, рак легкого, множественная миелома, рак яичника, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, остеосаркома, плоскоклеточная карцинома, опухоли оболочки (влагалища) периферических нервов, шваннома, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, эзофагеальный рак, глиобластома, светлоклеточная саркома мягкой ткани, злокачественная мезотелиома, нейрофиброматоз, рак почки и меланома).

Препаративные формы терапевтических и диагностических агентов можно приготавливать путем смешения с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, густых суспензий, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman и др., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, изд-во McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, изд-во Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, под ред. Avis и др., изд-во Marcel Dekker, NY, 1993; Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, под ред. Lieberman и др., изд-во Marcel Dekker, NY, 1990; Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, под ред. Lieberman и др., изд-во Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner и Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость циркуляции субстанции в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность субстанции и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. Схема введения предусматривает введение пациенту терапевтического средства в максимальных количествах, отличающихся приемлемым уровнем побочных действий. Таким образом, количество вводимого биологического агента зависит частично от конкретной субстанции и от серьезности состояния, подлежащего лечению. Известны руководства по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и малых молекул (см., например, Wawrzynczak, Antibody Therapy, изд-во Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, под ред. Kresina, изд-во Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, под ред. Bach, изд-во Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert и др., New Engl. J. Med. 348, 2003, сс. 601-608; Milgrom и др., New Engl. J. Med. 341, 1999, сс. 1966-1973; Slamon и др., New Engl. J. Med. 344, 2001, сс. 783-792; Benjaminovitz и др., New Engl. J. Med. 342, 2000, сс. 613-619; Ghosh и др., New Engl. J. Med. 348, 2003, сс. 24-32; Lipsky и др., New Engl. J. Med. 343, 2000, сс. 1594-1602).

Определение соответствующей дозы осуществляет лечащий врач, например, на основе параметров или факторов, которые как это известно или предполагается в данной области, влияют на лечение, или предполагается, что они должны влиять на лечение. Как правило, введение доз начинают с уровня, несколько более низкого, чем оптимальная доза, и затем повышают с небольшими инкрементами до достижения требуемого или оптимального действия, принимая во внимание любые отрицательные побочные действия. Важными диагностическими критериями являются указанные симптомы, например, воспаление или уровень производства воспалительных цитокинов.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях можно варьировать таким образом, чтобы получать количество действующего вещества, эффективное для достижения

требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента при использовании конкретной композиции и пути введения, и они не должны быть токсичными для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность применяемых конкретных композиций или сложного эфира, соли или амида, пути введения, продолжительности введения, скорости выделения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни подлежащего лечению пациента и аналогичных факторов.

Композиции, содержащие антитела или их фрагменты можно вводить путем непрерывной инфузии или с интервалами между введениями доз, составляющими, например, один день, одну неделю или 1-7 раз в неделю. Дозы можно вводить внутривенно, подкожно, местно, орально, назально, ректально, внутримышечно, внутричерепно или путем ингаляции. Конкретный протокол введения доз включает применение максимальной дозы или частоты введения доз, при которых удается избежать выраженных нежелательных побочных действий. Общая недельная доза может составлять по меньшей мере 0,05 мкг/кг веса тела, по меньшей мере 0,2 мкг/кг, по меньшей мере 0,5 мкг/кг, по меньшей мере 1 мкг/кг, по меньшей мере 10 мкг/кг, по меньшей мере 100 мкг/кг, по меньшей мере 0,2 мг/кг, по меньшей мере 1,0 мг/кг, по меньшей мере 2,0 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 25 мг/кг или по меньшей мере 50 мг/кг (см., например, Yang и др., *New Engl. J. Med.* 349, 2003, сс. 427-434; Herold и др., *New Engl. J. Med.* 346, 2002, сс. 1692-1698; Liu и др., *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67, 1999, сс. 451-456; Portielji и др., *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 2003, сс. 133-144). Требуемая доза антител или их фрагментов является примерно такой же, что и доза антитела или полипептида, при пересчете в виде количества молей/кг веса тела. Требуемая концентрация в плазме антител или их фрагментов является примерно такой же, что и при пересчете в виде количества молей/кг веса тела. Доза может составлять по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 100 мкг. Дозы можно вводить индивидууму по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 раз или более.

Доза антител или их фрагментов может составлять от 0,0001 до 100 мг/кг веса тела пациента. Доза может составлять от 0,0001 до 20 мг/кг, от 0,0001 до 10 мг/кг, от 0,0001 до 5 мг/кг, от 0,0001 до 2 мг/кг, от 0,0001 до 1 мг/кг, от 0,0001 до 0,75 мг/кг, от 0,0001 до 0,5 мг/кг, от 0,0001 до 0,25 мг/кг, от 0,0001 до 0,15 мг/кг, от 0,0001 до 0,10 мг/кг, от 0,001 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 0,25 мг/кг или от 0,01 до 0,10 мг/кг веса тела пациента.

Дозу антител или их фрагментов можно рассчитывать на основе веса тела пациента в килограммах (кг), умножая на количество доз, подлежащих введению (в мг/кг). Доза антител или их фрагментов, предлагаемых в изобретении, может составлять 150 мкг/кг или менее, 125 мкг/кг или менее, 100 мкг/кг или менее, 95 мкг/кг или менее, 90 мкг/кг или менее, 85 мкг/кг или менее, 80 мкг/кг или менее, 75 мкг/кг или менее, 70 мкг/кг или менее, 65 мкг/кг или менее, 60 мкг/кг или менее, 55 мкг/кг или менее, 50 мкг/кг или менее, 45 мкг/кг или менее, 40 мкг/кг или менее, 35 мкг/кг или менее, 30 мкг/кг или менее, 25 мкг/кг или менее, 20 мкг/кг или менее, 15 мкг/кг или менее, 10 мкг/кг или менее, 5 мкг/кг или менее, 2,5 мкг/кг или менее, 2 мкг/кг или менее, 1,5 мкг/кг или менее, 1 мкг/кг или менее, 0,5 мкг/кг или менее или 0,5 мкг/кг веса тела пациента или менее.

Стандартная доза антител или их фрагментов может составлять от 0,1 до 20 мг, от 0,1 до 15 мг, от 0,1 до 12 мг, от 0,1 до 10 мг, от 0,1 до 8 мг, от 0,1 до 7 мг, от 0,1 до 5 мг, от 0,1 до 2,5 мг, от 0,25 до 20 мг, от 0,25 до 15 мг, от 0,25 до 12 мг, от 0,25 до 10 мг, от 0,25 до 8 мг, от 0,25 до 7 мг, от 0,25 до 5 мг, от 0,5 до 2,5 мг, от 1 до 20 мг, от 1 до 15 мг, от 1 до 12 мг, от 1 до 10 мг, от 1 до 8 мг, от 1 до 7 мг, от 1 до 5 мг или от 1 до 2,5 мг.

Доза антител или их фрагментов можно обеспечивать титр в сыворотке индивидуума, составляющий по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225 по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375 или по меньшей мере 400 мкг/мл. В альтернативном варианте доза антител или их фрагментов может обеспечивать титр в сыворотке индивидуума, составляющий по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375 или по меньшей мере 400 мкг/мл.

Введение доз антител или их фрагментов можно повторять и интервал между их введением может составлять по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, 45 дней, 2 месяца, 75

дней, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев.

Эффективное для конкретного пациента количество может варьироваться в зависимости от таких факторов как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, путь введения и вводимая доза и серьезность побочных действий (см., например, Maunard и др., *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, изд-во Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, изд-во Urch Publ., London, UK, 2001).

Путь введения может представлять собой, например, местное или кожное нанесение, внутривенную, внутривнутрибрюшинную, интрацеребральную, внутримышечную, внутриглазную, внутриартериальную, внутрь спинного мозга, внутрь повреждения инъекцию или инфузию, или введение с помощью систем с замедленным высвобождением или с помощью имплантата (см., например, Sidman и др., *Biopolymers* 22, 1983, сс. 547-556; Langer и др., *J. Biomed. Mater. Res.* 15, 1981, сс. 167-277; Langer, *Chem. Tech.* 12, 1982, сс. 98-105; Epstein и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1985, сс. 3688-3692; Hwang и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1980, сс. 4030-4034; US №№ 6350466 и 6316024). При необходимости композиция может включать также солюбилизирующий агент и местное анестезирующее средство, такое как лидокаин, для облегчения боли в области инъекции. Кроме того, можно применять также легочное введение, например, с помощью ингалятора или распылителя, и препаративной формы с создающим аэрозоль агентом (см., например, US №. 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации PCT WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из документов полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки).

Композицию можно вводить также с помощью одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких различных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или механизм введения должен варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Выбранные пути введения антител или их фрагментов, предлагаемых в изобретении, представляют собой внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Под парентеральным введением подразумевают пути введения, отличные от энтерального и местного применения, как правило, путем инъекции, и они включают (но не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриоболочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, подпаутинную, интраспинальную, эпидуральную и надчрепную инъекцию и инфузию. В альтернативном варианте композицию можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный путь применения или нанесение на слизистую оболочку, например, интраназально, орально, вагинально, ректально, подъязычно или местно. Антитела или их фрагменты можно также вводить путем инфузии. Мультиспецифический эпитопсвязывающий белок можно вводить подкожно.

Если антитела или их фрагменты вводят с помощью системы с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, то для достижения контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения можно применять насос (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14, 1987, с. 20; Buchwald и др., *Surgery* 88, 1980, с. 507; Saudek и др., *N. Engl. J. Med.* 321, 1989, с. 574). Для достижения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств можно использовать полимерные материалы (см., например, *Medical Applications of Controlled Release*, под ред. Langer и Wise, изд-во CRC Pres., Boca Raton, Fla. 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, под ред. Smolen и Ball, изд-во Wiley, New York, 1984; Ranger и Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23, 1983, с. 61; см. также Levy и др., *Science* 228, 1985, с. 190; During и др., *Ann. Neurol.* 25, 1989, с. 351; Howard и др., *J. Neurosurg.* 71, 1989, с. 105; US №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; публикации PCT WO 99/15154 и WO 99/20253). Примерами полимеров, применяемых в препаративных формах с замедленным высвобождением являются (но не ограничиваясь только ими) поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловая кислота), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловая кислота), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимер лактида и гликолидов (PLGA) и сложные полиортоэферы. Полимер, применяемый в препаративной форме с замедленным высвобождением, является инертным, свободным от высвобождаемых примесей, стабильным при хранении, стерильным и биоразложимым. Систему с контролируемым или замедленным высвобождением можно помещать вблизи профилактической или терапевтической мишени, при этом требуется только часть дозы, необходимой для системного введения (см., например, Goodson, в: *Medical Applications of Controlled Release*, выше, т. 2, 1984, сс. 115-138).

Сведения о системах с контролируемым высвобождением обсуждены в обзоре у Langer, *Science* 249, 1990, сс. 1527-1533). Для получения препаративных форм с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько антител или их фрагментов можно применять любой метод, известный специалисту в данной области (см., например, US № 4526938, публикацию PCT WO 91/05548, публикацию PCT WO 96/20698, Ning и др., *Radiotherapy & Oncology* 39, 1996, сс. 179-189, Song и др., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50, 1995, сс. 372-397, Cleek и др., *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact.*

Mater. 24, 1997, сс. 853-854 и Lam и др., Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24, 1997, сс. 759-760, каждая публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Если антитела или их фрагменты применяют местно, то их можно приготавливать в форме мази, крема, трансдермального пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой формы, хорошо известной специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19-ое изд., изд-во Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995). В случае нераспыляемых местных лекарственных форм, как правило, применяют формы от вязких до полутвердых или твердые формы, которые содержат носитель или один или несколько эксципиентов, пригодных для местного нанесения, и которые имеют в некоторых случаях динамическую вязкость, более высокую, чем вода. Приемлемыми препаративными формами являются (но не ограничиваясь только ими) растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, линименты, целебные мази и т.п., которые при необходимости стерилизуют или смешивают с вспомогательными агентами (например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, буферами или солями) для воздействия на различные свойства, например, осмотическое давление. Другими приемлемыми местными лекарственными формами являются распыляемые аэрозольные препараты, в которых действующее вещество, в некоторых случаях в сочетании с твердым или жидким инертным носителем, упаковывают в смеси с находящимся под давлением летучим веществом (например, газообразным пропеллентом, таким как фреон) или в находящийся под давлением флакон. В фармацевтические композиции и лекарственные формы можно добавлять также при необходимости увлажнители или смачиватели. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в данной области.

Если композиции, содержащие антитела или их фрагменты, вводят интраназально, то их можно приготавливать в виде аэрозоля, спрея, образующего туман аэрозоля или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства, предназначенные для применения, удобно применять в форме аэрозольного спрея, образующегося из находящихся под давлением упаковок или распылителей, с использованием приемлемого пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или других пригодных газов). В случае находящегося под давлением аэрозоля стандартную дозу можно определять, используя клапан для введения отмеренного количества. Капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина), предназначенные для применения в ингаляторе или инсуффляторе, можно приготавливать так, чтобы они содержали порошкообразную смесь соединения и приемлемую порошкообразную основу, такую как лактоза или крахмал.

Методы совместного введения или лечения с использованием второго терапевтического средства, например цитокина, стероида, химиотерапевтического средства, антибиотика или излучения, известны в данной области (см., например, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, под ред. Hardman и др., 10-ое переработанное и дополненное изд., изд-во McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, под ред. Poole и Peterson, изд-во Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa., 2001; Cancer Chemotherapy and Biotherapy, под ред. Chabner и Longo, изд-во Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa., 2001). Эффективное количество терапевтического средства может уменьшать симптомы по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%; по меньшей мере примерно на 30%; по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%.

Дополнительные лекарственные средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые можно применять в сочетании с антителами или их фрагментами можно вводить с интервалом между их введением и введением антител или их фрагментов, составляющим менее 5 мин, менее 30 мин, 1 ч, примерно 1 ч, от примерно 1 до примерно 2 ч, от примерно 2 до примерно 3 ч, от примерно 3 до примерно 4 ч, от примерно 4 до примерно 5 ч, от примерно 5 до примерно 6 ч, от примерно 6 до примерно 7 ч, от примерно 7 до примерно 8 ч, от примерно 8 до примерно 9 ч, от примерно 9 до примерно 10 ч, от примерно 10 до примерно 11 ч, от примерно 11 до примерно 12 ч, от примерно 12 до 18 ч, от 18 до 24 ч, от 24 до 36 ч, от 36 до 48 ч, от 48 до 52 ч, от, 52 до 60 ч, от 60 до 72 ч, от 72 до 84 ч, от 84 до 96 ч или от 96 до 120 ч. Пациента можно подвергать воздействию двух или большего количества терапий во время одного визита.

Антитела или их фрагменты и другие терапевтические средства можно вводить циклически. Циклическая терапия предусматривает применение первой терапии (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение некоторого периода времени, после чего применение второй терапии (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение некоторого периода времени, необязательно с последующим применением третьей терапии (например, профилактического или терапевтического средства) в течение некоторого периода времени и т.д. и повторение указанной последовательности введения, т.е. цикла, для снижения развития устойчивости к одной из терапий, для избежания или снижения побочных действий одной из терапий и/или повышения эффективности терапий.

Антитела или их фрагменты можно приготавливать в виде форм, гарантирующих соответствующее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие обладающие высокой гидрофильностью соединения. Для гарантии того, что обладающие терапевтической активностью соединения пересекут ГЭБ (если это требуется), их можно включать, например, в липосомы. Ме-

тоды приготовления липосом описаны, например, в US № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы, что повышает направленное введение лекарственного средства (см., например, Ranade, J. Cline Pharmacol. 29, 1989, с. 685). Примерами обеспечивающих направленный перенос молекул являются фолат или биотин (см., например, US № 5416016 на имя Low с соавторами); маннозиды (Umezawa и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 1988, с. 1038); антитела (Bloeman и др., FEBS Lett. 357, 1995, с. 140; Owais и др., Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1995, с. 180); обладающий поверхностной активностью рецептор белка А (Briscoe и др., Am. J. Physiol. 1233, 1995, с. 134); p120 (Schreier и др., J. Biol. Chem. 269, 1994, с. 9090); (см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen, FEBS Lett. 346, 1994, с. 123; J.J. Killian; I.J. Fidler, Immunomethods 4, 1994, с. 273).

Предложены протоколы введения фармацевтической композиции, содержащей антитела или их фрагменты индивидуально или в сочетании с другими терапевтическими средствами, в которых нуждается индивидуум. Лекарственные средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые применяются в комбинированных терапиях можно вводить индивидууму совместно или их можно применять последовательно. Лекарственные средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые применяют в комбинированных терапиях можно применять циклически. Циклическая терапия предусматривает применение первой терапии (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение некоторого периода времени, после чего применение второй терапии (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение некоторого периода времени и повторение указанной последовательности введения, т.е. цикла, для снижения развития устойчивости к одной из терапий (например, к агенту), для избежания или снижения побочных действий одной из терапий (например, агентов) и/или повышения эффективности терапий.

Отдельные терапевтические компоненты (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированных терапий можно применять для обработки индивидуума совместно (конкурентно). Понятие "совместно" не ограничено применением терапий (например, профилактических или терапевтических средств) точно в одно и то же время, а скорее означает, что фармацевтическую композицию, которая содержит антитела или их фрагменты, вводят индивидууму в такой последовательности и с таким временным интервалом, что антитела могут действовать совместно в другой(им) терапией(ями), что обеспечивает повышенное благоприятное действие по сравнению с вариантом, когда их вводят как-то по-иному. Например, каждую терапию можно применять для обработки индивидуума в одно и то же время или последовательно в любом порядке в различные моменты времени; однако, если их не применяют в одно и то же время, их следует применять в достаточно близкие моменты времени, так, чтобы обеспечивать требуемое терапевтическое или профилактическое действие. Каждой терапии можно подвергать индивидуума по отдельности, в любой приемлемой форме и любым пригодным путем. Терапию (например, профилактические или терапевтические средства) можно осуществлять с интервалом индивидууму с интервалом, составляющим менее 15 мин, менее 30 мин, менее 1 ч, примерно 1 ч, от примерно 1 до примерно 2 ч, от примерно 2 до примерно 3 ч, от примерно 3 до примерно 4 ч, от примерно 4 до примерно 5 ч, от примерно 5 до примерно 6 ч, от примерно 6 до примерно 7 ч, от примерно 7 до примерно 8 ч, от примерно 8 до примерно 9 ч, от примерно 9 до примерно 10 ч, от примерно 10 до примерно 11 ч, от примерно 11 до примерно 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч или 1 неделю. Можно подвергать воздействию двух или большего количества терапий (например, профилактических или терапевтических средств) во время одного визита.

Профилактические или терапевтические средства, применяемые в комбинированных терапиях, можно вводить индивидууму в одной и той же фармацевтической композиции. Профилактические или терапевтические средства, применяемые в комбинированных терапиях, можно вводить индивидууму совместно в виде различных фармацевтических композиций. Профилактические или терапевтические средства можно вводить индивидууму с использованием одного и того же или различных путей введения.

Полностью описанное выше изобретение дополнительно проиллюстрировано в формуле изобретения, а также с помощью приведенных ниже примеров, которые служат только для иллюстрации изобретения и не направлены на его дополнительное ограничение.

Примеры

Пример 1. Методы, материалы и скрининг антител

(I) Клеточные линии

Клеточные линии ВХРС-3, SK-Br-3, BT-474, MDA-MB-453, FaDu и MCF-7 получали из ATCC и поддерживали стандартным образом в ростовых средах, дополненных 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS).

(II) Получение рекомбинантных векторов, включающих HER3 человека, обезьяны циномоглус (Суно), мыши и крысы

Внеклеточный домен мышинового HER3 амплифицировали с помощью ПЦР из кДНК головного мозга мышей (фирма Clontech) и последовательность подтверждали путем сравнения с референс-последовательностью (Refseq NM_010153). ECD крысиного HER3 получали путем обратной транскрип-

ции из мРНК клеток линии Rat-2 и последовательность подтверждали путем сравнения с NM_017218. кДНК-матрицу HER3 обезьяны циномоглус создавали, используя РНК из различных тканей обезьян циномоглус (фирма Zyagen Laboratories), и полученный с помощью ОТ-ПЦР продукт клонировали в векторе pCR®-ТОРО-XL (фирма Invitrogen) перед секвенированием обеих цепей. Человеческий HER3 получали из библиотеки кДНК головного мозга человеческого эмбриона (фирма Source) и последовательность подтверждали путем сравнения с NM_001982.

Для создания меченых рекомбинантных белков HER3 человека, мыши, крысы и обезьяны циномоглус амплифицировали с помощью ПЦР с использованием Pwo Taq-полимеразы (фирма Roche Diagnostics). Амплифицированные ПЦР-продукты очищали на геле и клонировали во входящем в систему Gateway® векторе pDonR201 (фирма Invitrogen), который предварительно модифицировали так, что он включал в рамке считывания N-концевую лидерную последовательность CD33 и C-концевую метку, например, FLAG-метку. Метка позволяла осуществлять очистку мономерных белков с помощью моноклонального антитела к метке. Гены-мишени фланкировали AttB1 и AttB2, что позволяло осуществлять рекомбинацию в адаптированных специальных запатентованных Gateway-векторах (например, pcDNA3.1), предназначенных для применения с использованием технологии клонирования Gateway® (фирма Invitrogen). Реакции рекомбинации осуществляли с использованием применяемой в технологии Gateway реакции с LR-клоназой (LR-реакции) с помощью запатентованных специальных векторов, которые содержали промотор CMV, для создания экспрессионных векторов для метки, хотя можно использовать любой поступающий в продажу вектор.

Кроме того, получали рекомбинантные белки HER3, в которых сливали ECD HER3 против хода транскрипции относительно С-концевого сайта расщепления фактора X и шарнирной области человеческого IgG и Fc-области, для создания белка с меченой Fc. Для этой цели различные ECD HER3 подвергали ПЦР-амплификации и клонировали в векторе (например, pcDNA3.1), модифицированном таким образом, что он содержал в рамке считывания С-концевое слияние: сайт фактора X-шарнир-hFc. Созданную открытую рамку считывания фланкировали сайтами AttB1 и AttB2 для дальнейшего клонирования согласно технологии рекомбинантного клонирования Gateway (фирма Invitrogen). Применяли LR-реакцию Gateway для переноса HER3-Fc в специальную экспрессионную конструкцию, содержащую промотор CMV. Создавали экспрессионные конструкции для несущего точечную мутацию HER3 с помощью стандартных протоколов сайтнаправленного мутагенеза и подтверждали последовательности полученных векторов.

Таблица 8. Создание экспрессионных векторов HER3. Нумерация аминокислот HER3 соответствует NP_001973 (человеческий), NP_034283 (мышинный) и NP_058914 (крысинный)

| Обозначение | Описание |
|------------------|---|
| Hu HER3 | CD33-[человеческий HER3, остатки 20-640]-метка |
| Mu HER3 | CD33-[мышинный HER3, остатки 20-643]-метка |
| Rat HER3 | CD33-[крысинный HER3, остатки 20-643]-метка |
| Cyno HER3 | CD33-[Cyno HER3, остатки 20-643]-метка |
| HER3 D1-2 | CD33-[человеческий HER3, остатки 20-329]-метка |
| HER3 D2 | CD33-[человеческий HER3, остатки 185-329]-метка |
| HER3 D3-4 | CD33-[человеческий HER3, остатки 330-643]-метка |
| HER3 D4 | CD33-[человеческий HER3, остатки 496-643]-метка |
| Hu HER3-Fc | [человеческий HER3, остатки 1-643]-Fc |
| Mu HER3-Fc | [мышинный HER3, остатки 1-643]-Fc |
| Cyno HER3-Fc | [Cyno HER3, остатки 1-643]-Fc |
| Rat HER3-Fc | [крысинный HER3, остатки 1-643]-Fc |
| HER3 D2-Fc | [человеческий HER3, остатки 207-329]-Fc |
| HER3 K267A | CD33-[человеческий HER3, остатки 20-640, K267A]-метка |
| HER3 L268A | CD33-[человеческий HER3, остатки 20-640, L268A]-метка |
| HER3 K267A/L268A | CD33-[человеческий HER3, остатки 20-640, K267A/L268A]-метка |

(III) Экспрессия рекомбинантных белков HER3

Требуемые рекомбинантные белки HER3 экспрессировали в полученных из HEK293 клеточных линиях, предварительно адаптированных к культивированию в суспензионной культуре, и выращивали в запатентованной фирмой Novartis бессывороточной среде. Для подтверждения маломасштабной экспрессии осуществляли анализы кратковременной трансфекции на основе липофекции в 6-луночных планшетах. Для крупномасштабного производства белка применяли кратковременную трансфекцию в системе, основанной на использовании 10-20-литровых биореакторов Wave™ (фирма Wave Biotech). В качестве носителя ДНК в плазмиде использовали полиэтиленимин (ПЭИ) (фирма Polysciences) в соотношении 1:3

(мас./мас). Супернатанты культуры собирали через 7-10 после трансфекции и концентрировали до очистки путем фильтрации в перекрестном потоке и диафильтрации.

(IV) Очистка меченого белка

Рекомбинантные меченые белки HER3 (например, метка-HER3) очищали, собирая супернатант клеточной культуры и 10-кратно концентрируя с помощью фильтрации в перекрестном потоке с использованием фильтра с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кДа (фирма Fresenius). Колонку с антителом к метке приготавливали, сшивая моноклональное антитело к метке с активированной CNBr сефарозой 4B в конечном соотношении 10 мг антитела на 1 мл смолы. Концентрированный супернатант вносили в 35-миллилитровую колонку с антителом к метке со скоростью потока 1-2 мл/мин. После исходной отмывки с помощью ЗФР связанный продукт элюировали с помощью 100мМ глицина (pH 2,7), нейтрализовали и стерилизовали фильтрацией. Концентрации белка определяли, измеряя абсорбцию при длине волны 280 нм, и превращали с помощью теоретического коэффициента, равного 0,66 AU/мг. Очищенный белок окончательно характеризовали с помощью ДСН-ПААГ, N-концевого секвенирования и ЖХ-МС.

(V) Очистка на основе Fc-метки

Концентрированный супернатант клеточной культуры вносили в 50-миллилитровую колонку с белком А-сефарозой типа Fast Flow со скоростью потока 1 мл/мин. После исходной отмывки с помощью ЗФР колонку отмывали 10мМ NaH₂PO₄/30 об.% изопропанола, pH 7,3, используя объем, равный 10 объемам колонки, а затем ЗФР, используя объем, равный 5 объемам колонки. И, наконец, связанный продукт элюировали с помощью 50мМ цитрата/140мМ NaCl (pH 2,7), нейтрализовали и стерилизовали фильтрацией.

(VI) Получение сверхэкспрессирующих клеточных линий

Для создания клеточной линии с высокими уровнями экспрессии HER3 на клеточной поверхности конструировали экспрессионный вектор млекопитающих, содержащий вставку, которая кодирует лидерную последовательность CD33 в обратном направлении относительно аминокислотных остатков 20-667 человеческого HER3, слитую в рамке считывания с аминокислотными остатками 669-1210 человеческого EGFR. При экспрессии в клетках млекопитающих образовавшийся химерный белок содержал на N-конце внеклеточный и трансмембранный домен HER3, а на C-конце цитоплазматический домен EGFR. Вектором HER3/1 трансфектировали клетки линии CHO-S (фирма Invitrogen) и после селекции с помощью антибиотика получали стабильные пулы. Для полученной клеточной линии (CHO HER3/1) характерны высокие уровни экспрессии внеклеточного домена HER3 на поверхности клеток.

(VII) Пэннинг с использованием библиотеки HuCAL GOLD®

Для отбора антител, распознающих человеческий HER3, применяли несколько стратегий пэннинга. Терапевтические антитела к человеческому белку HER3 создавали путем селекции клонов, обладающих высокой аффинностью связывания, используя в качестве источника вариантов белков антител поступающую в продажу фаговую дисплейную библиотеку (человеческая комбинаторная библиотека антител) HuCAL GOLD® (фирма MorphoSys).

Фагмидная библиотека основана на концепции HuCAL® (Knappik и др., J Mol Biol 296, 2000, сс. 57-86), и в ней применяют технологию CysDisplay® для презентации Fab на поверхности фага (WO 01/05950 на имя Lohning).

Для выделения антител к HER3 использовали стандартный пэннинг, а также RapMAT-стратегии пэннинга, используя такие подходы как твердофазный пэннинг, пэннинг в растворе, пэннинг целых клеток и дифференцированный пэннинг целых клеток.

(VIII) Твердофазный пэннинг

Для идентификации антител к HER3 применяли различные стратегии твердофазного пэннинга с использованием различных рекомбинантных белков HER3. Для осуществления каждого цикла твердофазного пэннинга сенсibilизировали Maxisorp-планшеты (фирма Nunc) белком HER3. Меченые белки иммобилизовывали с использованием планшетов, предварительно сенсibilизированных антителом к Fc (козье или мышинное антитело к человеческому IgG, фирма Jackson Immuno Research), антителом к метке, либо посредством пассивной адсорбции. Сенсibilизированные планшеты отмывали ЗФР и блокировали. Сенсibilизированные планшеты дважды отмывали ЗФР перед добавлением в течение 2 ч при комнатной температуре на шейкере связанных с фагами антител из библиотеки HuCAL GOLD®. Связанные фаги элюировали, добавляли к клеткам E. coli TG-1 и инкубировали для заражения фагом. Затем зараженные бактерии выделяли и высевали на агаровые пластины. Колонии соскабливали с пластин и фаги высвобождали ("процедура спасения") и амплифицировали. Каждая из стратегий пэннинга HER3 включала индивидуальные циклы пэннинга, и для нее применяли уникальные антигены, концентрации антигенов и строгость отмывки.

(IX) Жидкофазный пэннинг

Каждый цикл жидкофазного пэннинга осуществляли с использованием различных биотинилированных рекомбинантных белков HER3 и нейрегулина 1-β1 (фирма R&D Systems) или без него. Белки биотинилировали с помощью набора для биотинилирования EZ-link sulfo-NHS-LC (фирма Pierce) со-

гласно инструкциям производителя. 800 мкл шитых со стрептавидином магнитных гранул (Dynabeads, фирма Dynal) отмывали однократно ЗФР и блокировали в течение ночи с помощью реагента Chemiblocker (фирма Chemicon). Связанные с фагами антитела из библиотеки NuCAL GOLD и соответствующий биотинилированный HER3 инкубировали в реакционной пробирке. Стрептавидиновые магнитные гранулы добавляли в течение 20 мин и собирали с помощью сепаратора магнитных частиц (фирма Dynal). Связанные фаги элюировали из гранул Dynabeads, добавляя содержащий ДТТ буфер в каждую пробирку, и добавляли в клетки *E. coli* TG-1. Заражение фагом осуществляли аналогично методу, описанному для твердофазного пэннинга. Каждая из стратегий пэннинга HER3 включала индивидуальные циклы пэннинга, и для нее применяли уникальные антигены, концентрации антигенов и строгость отмывки.

(X) Клеточный пэннинг

Для клеточных пэннингов связанные с фагами антитела из библиотеки NuCAL GOLD® инкубировали примерно с 10^7 клеток на ротационном шейкере в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим центрифугированием. Клеточный дебрис изолировали, фаги элюировали из клеток. Супернатант собирали и добавляли в культуру *E. coli* TG-1 с помощью описанного выше процесса. Для идентификации антител к HER3 применяли две стратегии, основанные на применении клеток:

а) пэннинг целых клеток: В этой стратегии различные интактные клеточные линии применяли в качестве антигенов;

б) дифференцированный пэннинг целых клеток:

В этой стратегии последовательно использовали антигены, состоящие из клеток и рекомбинантных белков HER3 (см., например, 1981.09). Основанные на применении клеток пэннинги осуществляли согласно описанному выше методу, но в случае, когда в качестве антигенов применяли рекомбинантные белки, использовали протоколы твердофазного пэннинга. Для отмывки применяли ЗФР (2-3×) и PBST (2-3×).

(XI) Создание библиотеки RapMAT™ и осуществление циклов пэннинга

Для повышения аффинности связывания антител с сохранением диверсификации библиотек продукты, полученные в результате второго цикла как пэннинга в растворе, так и твердофазного пэннинга, использовали при осуществлении технологии RapMAT™ (технология "быстрого созревания"), в то время как для третьего цикла использовали продукты, полученные в результате пэннинга целых клеток и дифференцированного пэннинга целых клеток (Prassler и др., Immunotherapy; 1, 2009, сс. 571-583). RapMAT™-библиотеки создавали путем субклонирования содержащих кодирующие Fab вставки фагов, отобранных с помощью пэннинга, в дисплейном векторе pMORPH®25_bla_LHC, и их дополнительно расщепляли для создания либо библиотек H-CDR2 RapMAT™, либо библиотек L-CDR3 RapMAT™ с помощью обеспечивающих специфическую рестрикцию ферментов. Вставки заменяли с использованием касет для созревания TRIM (Virnekas и др., Nucleic Acids Research 22, 1994, сс. 5600-5607) для H-CDR2 или L-CDR3 в зависимости от состава пула. Установлено, что размеры библиотек составляли от 8×10^6 до 1×10^8 клонов. Получали комплекс RapMAT-антитело-фаг и подвергали двум дополнительным циклам пэннинга в растворе, твердофазного или клеточного пэннинга с использованием описанных выше экспериментальных методов.

Пример 2. Кратковременная экспрессия антител к HER3 IgG-типа

Адаптированные для выращивания в виде суспензионной культуры клетки HEK293-6E культивировали в среде BioWave20 до достижения плотности примерно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл. Клетки кратковременно трансфектировали соответствующей стерильной смесью ДНК: ПЭИ и дополнительно культивировали. Через 7 дней после трансфекции клетки удаляли путем фильтрации в перекрестном потоке, используя фильтры Fresenius (0,2 мкм). Свободный от клеток продукт концентрировали с помощью фильтрации в перекрестном потоке с использованием фильтра с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кДа (фирма Fresenius) и концентрат стерилизовали фильтрацией через Stericup®-фильтр (0,22 мкм). Стерильный супернатант хранили при 4°C.

Пример 3. Очистка антитела к HER3 IgG-типа

Очистку IgG осуществляли с использованием применяемой для исследовательских целей воздушной хроматографической системы АКТА 100 при 6°C в помещении с охлаждением, используя самонабивную колонку XK16/20 с 25 мл смолы Self-Pack® MabSelect SuRe (все фирмы GE Healthcare). Во всех случаях скорость потока составляла 3,5 мл/мин за исключением стадии загрузки, давление было ограничено величиной 5 бар. Колонку уравнивали ЗФР, используя объем, равный трем объемам колонки, перед загрузкой профильтрованного супернатанта после ферментации со скоростью 2,0 мл/мин. Колонку промывали ЗФР, используя объем, равный 8 объемам колонки. IgG элюировали с помощью градиента pH, используя в качестве исходной смеси 50 мМ цитрат/70 мМ NaCl (pH 4,5), линейно его снижая с использованием 12 объемов колонки до 50 мМ цитрат/70 мМ NaCl (pH 2,5), после чего осуществляли постоянную стадию обработки буфером с использованием 2 объемов колонки при таком же значении pH 2,5. Содержащие IgG фракции объединяли, сразу же нейтрализовали и стерилизовали фильтрацией (Millipore Steriflip, 0,22 мкм). Измеряли ОП₂₈₀ и рассчитывали концентрацию белка на основе данных о последовательности. Пулы тестировали по отдельности в отношении агрегации (SEC-MALS (гель-

фльтрация - многоугольное лазерное светорассеяние) и чистоты (ДСН-ПААГ и МС).

Пример 4. Экспрессия и очистка антител NuCAL®-Fab в *E. coli*

Экспрессию Fab-фрагментов, кодируемых pMORPH®X9_Fab_MH в TG-1-клетках, осуществляли во встряхиваемых культурах с использованием 500 мл среды 2xYT, дополненной 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры встряхивали при 30°C до достижения ОП₆₀₀ нм, равной 0,5. Экспрессию индуцировали добавлением 0,75мМ ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в течение 20 ч при 30°C. Клетки разрушали лизоцимом. Меченные His₆ Fab-фрагменты выделяли с помощью ИМАС (аффинная хроматография с иммобилизованным металлом) (фирма Bio-Rad). Осуществляли обмен буфера на 1×ЗФР Дульбекко (pH 7,2), используя колонки PD10. Образцы стерилизовали фильтрацией (0,2 мкм). Концентрации белков определяли с помощью УФ-спектрофотометрии.

Чистоту образцов анализировали с помощью 15% ДСН-ПААГ в денатурирующих восстанавливающих условиях. Гомогенность препаратов Fab определяли в необработанном состоянии с помощью гель-фльтрации (HP-SEC) с использованием калибровочных стандартов.

Пример 5. Измерение аффинности (K_D) антител к HER3 методом титрования уравновешенного раствора (SET)

Определение аффинности в растворе осуществляли, в целом, согласно методу, описанному в литературе (Friguet и др., *J Immunol Methods* 77, 1985, сс. 305-319). Для повышения чувствительности и точности метода SET этот метод изменяли, используя вместо классического ELISA-анализа технологию, основанную на применении электрохемилюминисценции (ECL) (Haenel и др., *Anal biochem* 339, 2005, сс. 182-184).

Для определения аффинности с помощью SET применяли описанные ранее конструкции немеченый HER3-метка (человеческий, крысиный, мышинный или обезьяны циномогус).

Данные оценивали с помощью программы XLfit (фирма ID Business Solutions), применяя общепринятые модели подбора. Для определения величины K_D для каждого IgG применяли следующую модель (модифицированную согласно методу, описанному у Piehler с соавторами (Piehler и др., *J Immunol Methods* 201, 1997, сс. 189-206).

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(x + \frac{[IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

[IgG]: применяемая общая концентрация IgG,

x: применяемая общая концентрация растворимого антигена (сайты связывания),

B_{max}: максимальный сигнал IgG без антигена,

K_D: аффинность.

Пример 6. Определение связывания антитела с клетками с помощью FACS

Связывание антител с эндогенным человеческим антигеном, экспрессируемым на человеческих раковых клетках, оценивали с помощью FACS.

Для определения значений EC₅₀ для антител SK-Br-3-клетки собирали с использованием аккутазы и разводили до концентрации 1×10⁶ клеток/мл в FACS-буфере (ЗФР/3% FBS/0,2% NaN₃). Добавляли по 1×10⁵ клеток в каждую лунку 96-луночного планшета (фирма Nunc) и центрифугировали при 210 × g в течение 5 мин при 4°C перед удалением супернатанта. К пеллетированным клеткам добавляли серийные разведения тестируемых антител (фактор разведения 1:4 в FACS-буфере) и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки отмывали и пеллетировали трижды, используя по 100 мкл FACS-буфера. В клетки добавляли конъюгированный с PE (фосфатидилэтаноламин) козий античеловеческий IgG (фирма Jackson ImmunoResearch), разведенный в соотношении 1/200 FACS-буфером, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Осуществляли дополнительные стадии отмывки, используя трижды 100 мкл FACS-буфера с последующими стадиями центрифугирования при 210 × g в течение 5 мин при 4°C. И, наконец, клетки ресуспендировали в 200 мкл FACS-буфера и уровни флуоресценции измеряли с помощью устройства FACSArea (фирма BD Biosciences). Количество связанного с клеточной поверхностью антитела к HER3 определяли, измеряя средний уровень флуоресценции в канале.

Пример 7. Связывание домена и мутанта HER3

96-луночные Maxisorp-планшеты (фирма Nunc) сенсibilizировали в течение ночи при 4°C с использованием 200 нг соответствующего рекомбинантного человеческого белка (HER3-метка, D1-2-метка, D2-метка, D3-4-метка, D4-метка, HER3 K267A-метка, HER3 L268A-метка, HER3 K267A/L268A и меченый контроль несоответствующего изоформа). Затем все лунки отмывали трижды ЗФР/0,1% Твин-20, блокировали в течение 1 ч с помощью ЗФР/1% БСА/0,1% Твин-20 и отмывали трижды ЗФР/0,1% Твин-20. Добавляли антитела к HER3 в требуемые лунки вплоть до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты отмывали трижды ЗФР/ 0,1% Твин-20 перед добавлением соответствующего связанного с пероксидазой идентифицирующего антитела, разведенного в соотношении 1/10000 в ЗФР/1% БСА/0,1% Твин-20. Применяемые идентифицирующие антитела пред-

ставляли собой козье антимышиное (фирма Pierce, № 31432), кроличье антикозье (фирма Pierce, № 31402) и козье античеловеческое антитело (фирма Pierce, № 31412). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч перед трехкратной отмывкой ЗФР/0,1% Твин-20. Добавляли во все лунки по 100 мкл раствора субстрата ТМБ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин) (фирма BioF_x) в течение 6 мин, после чего реакцию прекращали, добавляя 50 мкл 2,5% H₂SO₄. Степень связывания антитела к HER3 с каждым рекомбинантным белком оценивали по ОП₄₅₀ с помощью планшет-ридера SpectraMax (фирма Molecular Devices). При необходимости кривые дозовой зависимости анализировали с помощью программы Graphpad Prism.

Пример 8. Эпитопное картирование HER3 с помощью масс-спектрометрического определения обмена водорода на дейтерий

Материалы

D₂O-буфер получали путем растворения 25мМ ТБС (буферный раствор триэтанолamina) (pH 7,5)/500мМ NaCl в тяжелой воде (фирма Sigma). Восстанавливающий раствор представлял собой 50мМ формиатный буфер (pH 4), дополненный 500мМ ТСЕР, и раствор для прекращения реакции представлял собой 0,5 об.% трифторуксусной кислоты (ТФК) в воде. Буфер А включал 0,25% муравьиной кислоты/10% метанола/10% этиленгликоля в воде, а буфер Б включал 0,25% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Все химические соединения получали от фирмы Sigma, в растворители, имеющие чистоту, пригодную для ЖХВР, получали от фирмы Fisher Scientific.

Манипуляции с жидкостями и хроматография

Эксперименты с использованием автоматического масс-спектрометрического определения обмена водорода на дейтерий (HD_X MS) разрабатывали на основе методов и оборудования, которые описаны у Wales и др., Anal. Chem. 78, 2006, сс. 1005-1014). В целом, при проведении всех операций, связанных с работой с жидкостями, использовали манипулятор для работы с жидкостями типа Pal HTS (фирма LEAP Technologies), помещенный в охлаждаемый корпус, в котором поддерживали температуру на уровне 2°C. На корпусе манипулятора для работы с жидкостями были смонтированы клапан с 6 инъекционными портами и промывающая станция, облегчающие осуществление инъекции образцов в хроматографическую систему и отмывку шприцев. Хроматографическая система включала дополнительный клапан с 10 портами, Poroszyme®-колонку (2,1 мм × 30 мм) (картридж Poros® с иммобилизованным пепсином) (фирма Applied Biosystems), картридж Cap Trap для хроматографии с обращенной фазой, 0,5 мм × 2 мм (фирма Michrom Bioresources) и самонабивной эмиттер электроспрея в качестве аналитической колонки (100 мкм × ~60 мм, Kinetex 2,6 мкм C18, фирма Phenomenex). Головку клапана с 10 портами, сорбционный картридж и аналитическую колонку помещали в отдельный кожух, сделанный из алюминия, и поддерживали температуру на уровне -5°C с помощью пакетов термоэлектрических элементов Пельтье. Клапаны и колонки располагали таким образом, чтобы можно было осуществлять последовательно расщепление белков, обессоливание пептидов и хроматографию с обращенной фазой до внесения образца в источник ионизации в электроспрее (ESI) масс-спектрометра (типа LTQ-Orbitrap, фирма Thermo Scientific).

Потоки жидкости, необходимые для работы, обеспечивали с помощью двух отдельных насосов для ЖХВР. Первый насос для ЖХВР (насос Surveyor MS, фирма Thermo Scientific) подавал буфер А с постоянной скоростью 125 мкл/мин и его использовали для переноса образца через картридж с иммобилизованным пепсином на сорбционный картридж с обращенной фазой, установленный за клапаном с 10 портами. После осуществления загрузки и обессоливания клапан с 10 портами переключали для элюции образца с помощью градиентного насоса (типа AQUITY UPLC, фирма Waters) из сорбционного картриджа с обращенной фазой через аналитическую колонку в источник ионов масс-спектрометра. Картридж с иммобилизованным ферментом удаляли после истощения в процессе градиентной элюции. Градиентный насос создавал участки линейного градиента от 0 до 40% подвижной фазы Б в течение 35 мин при скорости 5 мкл/мин и от 40 до 95% подвижной фазы Б при скорости 5 мкл/мин в течение 10 мин. Градиентный поток, выходящий из насоса, разделяли в клапане с 10 портами с использованием пассивного делителя (сплиттера) таким образом, чтобы фактический поток через сорбционный картридж и аналитическую колонку при градиентной элюции составлял ~1 мкл/мин. Весь хроматографический цикл занимал 70 мин, включая стадии отмывки и уравнивания.

Масс-спектрометрия

Для идентификации протеолитических фрагментов, полученных путем осуществляемого в режиме онлайн (в ходе эксперимента) расщепления, проводили несколько зависящих от данных МС/МС-экспериментов. Для сбора этих данных осуществляли регистрацию тандемных МС-спектров с помощью анализатора LTQ гибридного масс-спектрометра LTQ-Orbitrap. Предварительное разделение масс осуществляли на основе результатов МС-сканирования, которые регистрировали с помощью анализатора Orbitrap. Сбор данных после проведения одной МС-стадии для определения уровней дейтерирования, осуществляли при разрешении 60000 с помощью анализатора Orbitrap (в диапазоне величин m/z 400-2000).

Приготовление образцов белков и комплексов белок/Fab

Образцы белка HER3 приготавливали, растворяя 50 мкг связанного с меткой HER3 (HER3-метка) в 25мМ ТБС (pH 7,5)/500мМ NaCl, с получением конечного объема 50 мкл. Для приготовления комплексов

белок:Fab смешивали 50 мкг HER3-метка в молярном соотношении 1:1 с изучаемым Fab. Затем смеси белок:Fab разводили до конечного объема 50 мкл 25мМ TBS (pH 7,5)/500мМ NaCl.

После получения комплексов белок:Fab их выдерживали по меньшей мере в течение 2 ч при 4°C. Перед началом каждого эксперимента четыре 96-луночных планшета, содержащих образец, разбавитель, агент для прекращения реакции и восстанавливающие растворы, вносили в устройство для работы с жидкостями. В экспериментах по обмену 50 мкл HER3 или комплекса HER3:Fab разводили 150 мкл D₂O-буфера. Смесь восстанавливали, добавляя 200 мкл восстанавливающего буфера за 1 мин до прекращения реакции, которую останавливали с помощью 600 мкл буфера для прекращения реакции. Общий объем после всех стадий работы с жидкостями составлял ~1 мл. После смешения раствор для прекращения реакции инъецировали в хроматографическую систему, с помощью которой его автоматически расщепляли, разделяли и анализировали методом ЖХ-МС. Рассчитывали среднее изменение дейтеризации между образцом и контролем в виде различия между уровнями поглощения дейтерия образцом и контролем.

Обработка результатов

Файлы необработанных данных (RAW-файлы), полученные с помощью Orbitrap, преобразовывали в файлы mzXML с помощью разработанной для этой цели на фирме программы (RawXtract). Затем собранные результаты тандемной MS анализировали с помощью SEQUEST (фирма Yates Lab, Scripps Research Institute, Ла-Джолла, Калифорния) и результаты исследования подвергали автоматической фильтрации с помощью программы DTASelect 2.0 (фирма Yates Lab, Scripps Research Institute, Ла-Джолла, Калифорния). С использованием результатов идентификации пептидных последовательностей применяли разработанную на фирме программу для автоматического выделения одноионных хроматограмм для каждой идентифицированной последовательности и создания усредненных спектров в области хроматографического пика. Усредненные спектры сглаживали и центрировали. Уровень поглощения дейтерия оценивали по разнице между массой, соответствующей дейтерированному образцу, и массой, соответствующей недейтерированному эталону. Обработанные данные валидировали вручную и корректировали для исправления неточностей и ошибок, обусловленных автоматизированными стадиями обработки. Каждому остатку в белковой последовательности приписывали уровни поглощения дейтерия путем деления содержания дейтерия по длине каждого пептида (т.е. путем деления обнаруженного уровня дейтеризации на количество аминокислот в пептиде). В том случае, когда остаток входил в (перекрывался) более чем один пептид, производили усреднение стандартизованных уровней поглощения дейтерия всеми пептидами, перекрывающими этот остаток.

Пример 9. Определение кристаллической структуры комплексов человеческий HER3/MOR09823 Fab и человеческий HER3/MOR09825 Fab с помощью рентгеновской кристаллографии

В настоящем примере описаны кристаллические структуры комплексов, включающих полноразмерный HER3, связанный с Fab-фрагментом MOR09823 и с Fab-фрагментом MOR09825, полученные с разрешением 3,2Å и 3,4Å соответственно. Меченый человеческий HER3 дополнительно очищали на колонке NiLoad 26/60 Супердекс 200 PrepGrade (фирма GE Healthcare), уравновешенной в ЗФР (pH 7,3). Экспрессируемые в *E. coli* Fab-фрагменты MOR09823 и MOR09825 выделяли путем лизиса клеток с помощью лизоцима и меченные His₆ Fab-фрагменты иммобилизовывали на колонке HisTrap_HP (фирма GE Healthcare). Fab-фрагменты MOR09823 дополнительно очищали путем гель-фильтрации с использованием колонки Супердекс 75 16/60 (фирма GE Healthcare), уравновешенной 25мМ Трис (pH 7,5), 150 мМ NaCl.

Комплексы HER3-Fab получали, смешивая избыток Fab с меченым HER3 в молярном соотношении 1,3-1,8:1 (концентрацию определяли по абсорбции при 280 нм, используя рассчитанные коэффициенты экстинкции, составляющие 0,9 и d 1,4 (мг/мл)⁻¹см⁻¹ для HER3 и Fab соответственно) и осуществляя очистку комплексов на колонке Супердекс 200 10/300 (фирма GE Healthcare), уравновешенной 25мМ Трис (pH 7,5), 150 мМ. Пиковые фракции анализировали с помощью ДСН-ПААГ и ЖХ-МС. Для каждого комплекса фракции, содержащие и HER3, и Fab примерно в эквимольном соотношении, объединяли и концентрировали. Кристаллы HER3/MOR09823 выращивали при 293К методом сидящей капли путем диффузии паров из капель, содержащих 150 нл комплекса HER3/MOR09823, и 150 нл раствора в резервуаре (100 мМ цитрат натрия, pH 5,6, 20% ПЭГ 4000 и 20% изопропанола). Кристаллы переносили в раствор в резервуаре, содержащий дополнительно 8% глицерина, и быстро охлаждали в жидком азоте. Кристаллы HER3/MOR09825 выращивали при 293К методом сидящей капли путем диффузии паров из капель, содержащих 150 нл комплекса HER3/MOR09825, и 150 нл раствора в резервуаре (100мМ бис-Трис, pH 6,5, 16% ПЭГ 10000). Кристаллы переносили в 100мМ бис-Трис, pH 6,5, 18% ПЭГ 10000 и 22% глицерина и быстро охлаждали в жидком азоте.

Данные собирали на оси пучка 17-ID усовершенствованного рентгеновского источника фотонов (Advanced Photon Source) (фирма Argonne National Laboratory). Данные, измеренные для комплекса HER3/Fab MOR09823, обрабатывали и получали структуру с разрешением 3,2Å с использованием HKL2000 (фирма HKL Research Inc) в пространственной группе I222 с размерами ячейки a=124,16, b=139,44, c=180,25 Å при высоком уровне статистической достоверности. Структуру HER3/Fab MOR09823 определяли методом молекулярного замещения с помощью программы Phaser (McCoey и др., J. Appl. Cryst. 40, 2007, сс. 658-674) с использованием Fab-фрагментов и опубликованной структуры ECD

HER3 1mb6 в качестве поисковых моделей. Конечную модель, которая содержала 1 молекулу комплекса HER3/Fab MOR09823 на асимметричную единицу, строили с помощью программы COOT (Crystallographic Object-oriented Toolkit (набор "инструментов", предназначенных для работы с кристаллографическими объектами), Emsley и Cowtan, Acta Cryst. 60, 2004, сс. 2126-2132) и уточняли до величин R и R_{free} , составляющих 19,0 и 24,5% соответственно при величинах $gmsd$, составляющих 0,010 Å и $1,37^\circ$ для длин связей и углов связей соответственно, с помощью программы BUSTER (фирма Global Phasing, LTD). Остатки HER3, которые содержали атомы, находящиеся на расстоянии в пределах до 5 Å от любого из атомов Fab MOR09823 по результатам идентификации с помощью программы PyMOL (Schrödinger, LLC), приведены в табл. 11 и 12. Данные, измеренные для комплекса HER3/Fab MOR09825, обрабатывали и получали структуру с разрешением 3,4 Å с помощью программы autoPROC (фирма Global Phasing, LTD) в пространственной группе I222 с размерами ячейки $a=124,23$, $b=140,94$, $c=180,25$ Å при высоком уровне статистической достоверности. Структуру HER3/Fab MOR09825 определяли методом молекулярного замещения с помощью программы Phaser (McCoу и др., J. Appl. Cryst. 40, 2007, сс. 658-674) с использованием структуры HER3/Fab MOR09823 в качестве поисковой модели. Конечную модель, которая содержала 1 молекулу комплекса HER3/Fab MOR09825 на асимметричную единицу, строили с помощью программы COOT (Emsley и Cowtan, Acta Cryst. 60, 2004, сс. 2126-2132) и уточняли до величин R и R_{free} , составляющих 18,8 и 24,9% соответственно при величинах $gmsd$, составляющих 0,009 Å и $1,21^\circ$ для длин связей и углов связей соответственно, с использованием программы BUSTER (фирма Global Phasing, LTD). Остатки HER3, которые содержали атомы, находящиеся на расстоянии в пределах до 5 Å от любого из атомов Fab MOR09825 по результатам идентификации с помощью программы PyMOL (Schrödinger, LLC), приведены в табл. 13 и 14.

Пример 10. Анализы фосфо-HER3 *in vitro* в клетках Клетки линии MCF-7 поддерживали стандартным методом в среде DMEM/F12, 15мМ HEPES, L-глутамин, 10% FCS, а клетки линии SK-Br-3 в среде МакКоя 5а, 10% FCS, 1,5мМ L-глутамин. Выращенные в полной среде до субконфлюэнтности клетки MCF7 или SK-Br-3 собирали с использованием аккутазы (фирма PAA Laboratories) и ресуспендировали в соответствующей среде для роста в конечной концентрации 5×10^5 клеток/мл. Затем по 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета (фирма Nunc) с получением конечной плотности 5×10^4 клеток/лунку. MCF7-клеткам давали прикрепиться в течение примерно 3 ч, после чего среду заменяли на минимальную среду, содержащую 0,5% FBS. Затем все планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C , после чего обрабатывали взятыми в требуемой концентрации антителами к HER3 (разведенными в соответствующих средах) в течение 80 мин при 37°C . MCF7-клетки обрабатывали 50 нг/мл нейрегулина 1-β1, содержащего домен EGF (фирма R&D Systems), в течение последних 20 мин для стимуляции фосфорилирования HER3. Все среды осторожно аспирировали и клетки промывали охлажденным на льду ЗФР, который содержал 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 (фирма Gibco). Клетки лизировали, добавляя 50 мкл охлажденного на льду лизирующего буфера (20 мМ Трис (pH 8,0)/137 мМ NaCl/10% глицерина/2 мМ ЭДТК/1% NP-40/1 мМ ортованадат натрия/апротинин (10 мкг/мл)/ лейпептин (10 мкг/мл)), и инкубировали на льду при встряхивании в течение 30 мин. Затем лизаты собирали и центрифугировали при 1800 г в течение 15 мин при 4°C для удаления клеточного дебриса. В предварительно подготовленный планшет для иммобилизации добавляли по 20 мкл лизата.

Для создания планшетов для иммобилизации HER3 использовали планшет из углеродного волокна (фирма Mesoscale Discovery), сенсibilизированный в течение ночи при 4°C 20 мкл (4 мкг/мл) иммобилизованным антителом MAB3481 (фирма R&D Systems), которое разводили в ЗФР и затем блокировали с помощью 3% бычьего сывороточного альбумина в $1 \times$ Трис-буфере (фирма Mesoscale Discovery)/0,1% Твин-20. HER3 иммобилизовывали из лизата, инкубируя планшет при комнатной температуре в течение 1 ч при встряхивании, после чего лизат аспирировали и лунки отмывали $1 \times$ Трис-буфером (фирма Mesoscale Discovery)/0,1% Твин-20. Фосфорилированный HER3 выявляли, используя 0,75 мкг/мл биотинилированного антитела к фосфотирозину (фирма R&D Systems), приготовленного в 1% БСА/ $1 \times$ Трис/0,1% Твин-20, путем инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки отмывали 4 раза с помощью $1 \times$ Трис/0,1% Твин-20 и биотинилированные белки выявляли путем инкубации с меченым S-меткой стрептавидином (фирма Mesoscale Discovery), разведенным в 1% БСА/ $1 \times$ Трис/0,1% Твин-20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Содержимое каждой лунки аспирировали и отмывали 4 раза $1 \times$ Трис/0,1% Твин-20 перед добавлением 20 мкл Т-буфера для считывания с сурфактантом (фирма Mesoscale Discovery) и количественно оценивали сигналы с помощью устройства Mesoscale Sector Imager. Антитела MOR06391 или MOR03207 включали в эксперименты по оценке передачи сигнала в качестве контролей изотипов.

Пример 11. Анализы фосфо-Akt (S473) *in vitro* в клетках

Выращенные в полной среде до субконфлюэнтности клетки линий SK-Br-3 и BT-474 собирали с использованием аккутазы (фирма PAA Laboratories) и ресуспендировали в соответствующей среде для роста в конечной концентрации 5×10^5 клеток/мл. Затем по 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета (фирма Nunc) с получением конечной плотности 5×10^4 клеток/лунку. Затем все планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C , после чего обрабатывали взя-

тыми в требуемой концентрации антителами к HER3 (разведенными в соответствующих средах) в течение 80 мин при 37°C. Все среды осторожно аспирировали и клетки промывали охлажденным на льду 3ФР, который содержал 1 mM CaCl₂ и 0,5 mM MgCl₂ (фирма Gibco). Клетки лизировали, добавляя 50 мкл охлажденного на льду лизирующего буфера (20 mM Трис (pH 8,0)/137 mM NaCl/10% глицерина/2 mM ЭДТК/1% NP-40/1 mM ортованадат натрия/апротинин (10 мкг/мл)/лейпептин (10 мкг/мл)), и инкубировали на льду при встряхивании в течение 30 мин. Затем лизаты собирали и центрифугировали при 1800 g в течение 15 мин при 4°C для удаления клеточного дебриса. По 20 мкл лизата добавляли в многоточечный 384-луночный планшет из углеродного материала, предназначенный для оценки фосфо-Akt (фирма Mesoscale Discovery), который предварительно блокировали 3% БСА/1×Трис/0,1% Твин-20. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании, после чего лизат аспирировали и лунки отмывали 4 раза 1×Трис-буфером (фирма Mesoscale Discovery)/ 0,1% Твин-20. Фосфорилированную Akt выявляли, используя 20 мкл несущего сульфо-метку антитела к фосфо-Akt (S473) (фирма Mesoscale Discovery), разведенного в 50 раз в 1% БСА/1×Трис/0,1% Твин-20, осуществляя инкубацию при встряхивании при комнатной температуре в течение 2 ч. Лунки отмывали 4 раза 1×Трис/0,1% Твин-20 перед добавлением 20 мкл Т-буфера для считывания с сурфактантом (фирма Mesoscale Discovery) и количественно оценивали сигналы с помощью устройства Mesoscale Sector Imager. Антитела MOR06391 или MOR03207 включали в эксперименты по оценке передачи сигнала в качестве контролей изотипов.

Пример 12. Анализы пролиферации клеточных линий

Клетки линии SK-Bv-3 культивировали стандартным методом в модифицированной среде МакКоя 5А, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, а клетки линии BT-474 культивировали в среде DMEM, дополненной 10% FBS. Субконфлюэнтные клетки обрабатывали трипсином, отмывали 3ФР, разводили до 5×10^4 клеток/мл средами для роста и высевали в 96-луночный черный планшет с прозрачным дном (Costar 3904) с плотностью 5000 клеток/лунку. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего добавляли взятое в требуемой концентрации антитело к HER3 (как правило, конечные концентрации составляли 10 или 1 мкг/мл). Планшеты возвращали в инкубатор, где выдерживали в течение 6 дней перед оценкой жизнеспособности клеток с помощью набора CellTiter-Glo (фирма Promega). Добавляли по 100 мкл раствора CellTiter-Glo в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре при осторожном встряхивании в течение 10 мин. Уровень люминесценции определяли с помощью планшет-ридера SpectraMax (фирма Molecular Devices). Степень ингибирования роста при применении каждого антитела рассчитывали путем сравнения уровней люминесценции, полученных при использовании каждого антитела к HER3, с уровнями, полученными при использовании стандартного применяемого для контроля изотипа контрольного антитела (MOR06391).

Для анализов пролиферации MCF-7 культивировали стандартным методом в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 4 mM L-глутамин/15 mM HEPES/10% FBS. Субконфлюэнтные клетки обрабатывали трипсином, отмывали 3ФР, разводили до 1×10^5 клеток/мл смесью сред DMEM/F12 (1:1), содержащей 4 mM L-глутамин/ 15 mM HEPES/10 мкг/мл человеческого трансферрина/0,2% БСА. Клетки высевали в 96-луночный черный планшет с прозрачным дном (Costar) с плотностью 5000 клеток/лунку. Затем добавляли взятое в требуемой концентрации антитело к HER3 (как правило, конечные концентрации составляли 10 или 1 мкг/мл) В соответствующие лунки добавляли также для стимуляции роста 10 нг/мл NRG1-β1, содержащего EGF-домен, фирма (R&D Systems). Планшеты возвращали в инкубатор, где выдерживали в течение 6 дней перед оценкой жизнеспособности клеток с помощью набора CellTiter-Glo (фирма Promega). Степень ингибирования роста при применении каждого антитела рассчитывали путем вычитания фоновых уровней люминесценции (без нейрегулина) и сравнения уровней, полученных при использовании каждого антитела к HER3, с уровнями, полученными при использовании стандартного применяемого для контроля изотипа контрольного антитела (MOR06391).

Пример 13. Клеточные анализы блокирования лиганда

Клетки линии MCF-7, которые культивировали в среде MEM, дополненной 10% FBS и 1 мкг/мл инсулина (фирма Sigma), смывали и собирали в небольшом объеме буфера для клеточной диссоциации FACSmax (фирма Genlantis), после чего добавляли 5 мл FACS-буфера (3ФР/1% FBS/0,1% азида натрия). Определяли плотность клеток и доводили до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Добавляли по 100 мкл клеточной суспензии в каждую лунку 96-луночного планшета и клетки пеллетировали центрифугированием (220 g, 3 мин, 4°C). Клеточный дебрис ресуспендировали в 100 мкл соответствующих тестируемых антител, разведенных в FACS-буфере (как правило, конечные концентрации антител составляли от 100 до 0,1 nM), и планшет инкубировали на льду в течение 45 мин. Блокирующее лиганд антитело MAB3481 (фирма R&D Systems) включали в опыт в качестве положительного контроля. Клетки отмывали дважды буфером для окрашивания, после чего добавляли 10нM NRG1-β1, содержащий EGF-домен (фирма R&D Systems), разведенный в FACS-буфере, и инкубировали на льду в течение 45 мин. Клетки отмывали дважды буфером для окрашивания и связанный нейрегулин выявляли путем инкубации клеток с 10нM антителом к EGF-домену человеческого NRG1-β1 (фирма R&D Systems), на льду в течение 45 мин. Клетки отмывали дважды буфером для окрашивания и инкубировали на льду в течение 45 мин со связанным с PE-антикозным антителом (фирма Jackson ImmunoResearch), разведенным в соотношении

1/500 FACS-буфером. Затем клетки пеллетировали путем центрифугирования и дебрис ресуспендировали в 200 мкл FACS-буфера. Для количественной оценки каждого образца по 10000 живых клеток оценивали с помощью проточного цитометра LSR II (фирма BD Biosciences) и количество связанного с клеточной поверхностью нейрегулина определяли, измеряя средний уровень флуоресценции в канале.

Пример 14. Биохимический анализ блокирования лиганда

Настоящий метод включает использование биосенсора (Biacore™, GE Healthcare, Уппсала, Швеция), применяемого для измерения резонанса поверхностного плазмона (SPR) для определения способности комплексов антител к HER3 связываться с нейрегулином.

Метод Biacore™ основан на явлении резонанса поверхностного плазмона (SPR) для выявления и количественной оценки взаимодействий при связывании. В типичном Biacore-эксперименте одну из взаимодействующих молекул (нейрегулин) иммобилизуют на матриксе, а партнер по взаимодействию (HER3) протекает по поверхности. Взаимодействие при связывании приводит к увеличению массы на поверхности сенсора и соответствующему непосредственному изменению показателя преломления среды вблизи поверхности сенсора. Изменения показателя преломления или сигнала считывают в виде единиц резонанса (R.U.). Мониторинг изменения сигнала, связанных с ассоциацией и диссоциацией комплексов, осуществляют неинвазивным путем, непрерывно и в реальном времени, полученные результаты выражают в виде сенсограмм.

Устройство Biacore™ T100 (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция) использовали для осуществления всех описанных экспериментов. Подготовку сенсорной поверхности и анализ взаимодействия осуществляли при 25 С. Буфер и реагенты для Biacore-анализа покупали у фирмы GE Healthcare. В анализе использовали подвижный буфер, содержащий 10мМ Hepes, pH 7,4/150мМ NaCl, 0,05% P20, 0,5% БСА.

Внеклеточный домен NRG-1β1 (фирма R&D Systems) инкубировали на льду в течение 45 мин с реагентом для биотинилирования EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-LC-биотин (фирма Pierce) в молярном соотношении 5:1. Реакцию прекращали, добавляя избыток этаноламина, и несвязанный биотин удаляли из биотинилированного NRG с помощью обессоливающих вращающихся колонок (фирма Zeba). Биотинилированный NRG иммобилизовывали на сенсорном чипе CAP, предварительно иммобилизованным с помощью примерно 3000 R.U. ssНКД-стрептавидина (набор Biotin CAPture), с получением поверхностной плотности нейрегулина, составляющей 400 - 600 R.U. Проточную референс-ячейку приготавливали, исключая из стадий инъекции инъекцию биотинилированного NRG, в результате чего на поверхности проточной ячейки присутствовал только ssДНК-стрептавидин.

Комплексы HER3/антитело создавали, инкубируя 10нМ человеческий HER3-Fc с взятым в возрастающих концентрациях (0 - 50нМ) соответствующим тестируемым антителом в течение 15 мин при комнатной температуре, перед инкубацией в Biacore™ при 10°C. Для анализа взаимодействия инъецировали комплексы HER3/антитело на поверхность референс-ячейки и на содержащие нейрегулин поверхности в виде серий по 180 с со скоростью потока 60 мкл/мин. Осуществляли мониторинг диссоциации комплексов в течение 180 с при скорости потока 60 мкл/мин. В конце каждого цикла анализов осуществляли регенерацию поверхности путем инъекции в течение 120 с смеси 8М гуанидин:1М NaOH (3:1) с последующей инъекцией в течение 120 с смеси 30% ацетонитрила/0,25М NaOH со скоростью потока 30 мкл/мин.

Пример 15. Фармакодинамические (ФД) исследования in vivo

Клетки линии VxPC3 и BT-474 культивировали и имплантировали самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (фирма Harlan Laboratories) согласно методу, описанному в примерах 16 и 17.

После достижения опухолями требуемого размера у животных оценивали качество опухолей. Животных с изъязвленными опухолями или животных с заполненными жидкостью опухолями исключали из эксперимента. Оставшимся животным вводили внутривенно дозы антител путем инъекции в латеральную хвостовую вену. В указанные моменты времени животных умерщвляли посредством асфиксии, вызванной CO₂, и получали образцы цельной крови путем сердечной пункции и помещали их в 1,5-миллилитровые пробирки Эппендорфа для сбора образцов. Опухолевую ткань немедленно иссекали, помещали в пропиленовую пробирку для образцов с закручивающейся крышкой и быстро замораживали в жидком азоте. Ткань хранили при -80°C до приготовления лизатов.

Пример 16. Изучение эффективности in vivo с использованием клеток линии BT-474

Клетки линии BT-474 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки без антибиотиков, вплоть до момента имплантации.

За 1 день до инокуляции клеток самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (фирма Harlan Laboratories) имплантировали подкожно гранулу, обеспечивающую постоянное высвобождение 17β-эстрадиола (фирма Innovative Research of America) для поддержания уровней сывороточного эстрогена. Через 1 день после имплантации содержащей 17 β-эстрадиол гранулы инъецировали ортотопически в 4-ую "жировую подушку" грудной железы 5×10⁶ клеток в суспензии, содержащей свободный от 50% фенолового красного матригель (фирма BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса. Общий инъекционный объем, содержащий клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Через 20 дней после имплантации клеток животных, объем опухолей, у которых достигал примерно 200 мм³, включали в опыт по исследова-

нию эффективности. Всего в опытах по исследованию эффективности использовали по 10 животных на группу.

Для исследований с использованием одного агента животным вводили путем инъекции в латеральную хвостовую вену дозы либо MOR10701, либо MOR10703. Начальную ударную дозу 40 мг/кг применяли в качестве первой дозы. После введения начальной дозы животным вводили 20 мг/кг через день в течение всего времени эксперимента. Для изучения эффективности комбинаций животным вводили дозы либо MOR10701, либо MOR10703 (20 мг/кг, iv, q2d) и субоптимальную дозу трастузумаба (1 мг/кг, iv, 2qw).

На протяжении всего опыта объем опухоли измеряли дважды в неделю с помощью кронциркуля. Процент величин, обнаруженный в обрабатываемой группе/контрольной группе (T/C), рассчитывали с помощью следующей формулы:

$$\% T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C, \text{ если } \Delta T > 0$$

в которой

T обозначает средний объем опухолей в обработанной лекарственным средством группе в последний день опыта;

ΔT обозначает средний объем опухолей в обработанной лекарственным средством группе в последний день опыта минус средний объем опухолей в обработанной лекарственным средством группе в первый день дозирования;

C обозначает средний объем опухолей в контрольной группе в последний день опыта; и

ΔC обозначает средний объем опухолей в контрольной группе в последний день опыта минус средний объем опухолей в контрольной группе в первый день дозирования.

Вес тела определяли дважды в неделю и дозу пересчитывали, исходя из веса тела. Изменение веса тела (в %) рассчитывали в виде $(BW_{\text{текущий}} - BW_{\text{начальный}}) / (BW_{\text{начальный}}) \times 100$. Данные представлены в виде изменения веса тела в % относительно веса в день начала обработок.

Все данные выражали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение среднего (SEM). Разницу в объемах опухолей и весе тела использовали для статистических анализов. Сравнение между группами осуществляли с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием апостериорного критерия Тьюки. При всех статистических оценках принимали, что различия являются значимыми при $p < 0,05$. Представлены данные о значимости различий относительно обработанной наполнителем контрольной группы.

Пример 17. Изучение эффективности *in vivo* с использованием клеток линии VxPC3

Клетки линии VxPC3 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки без антибиотиков, вплоть до момента имплантации.

Самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (фирма Harlan Laboratories) имплантировали подкожно 10×10^6 клеток в смеси 50% забуференного фосфатом физиологического раствора и 50% матригеля. Общий инъекционный объем, содержащий клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Когда объем опухолей достигал примерно 200 мм³, животных включали в опыт по исследованию эффективности. Всего в опытах по исследованию эффективности использовали по 10 животных на группу. Животных не включали в опыт, если у них были обнаружены необычные характеристики роста опухолей перед включением в опыт.

Животным вводили дозы путем инъекции в латеральную хвостовую вену. Начальную ударную дозу 40 мг/кг применяли в качестве первой дозы. После введения начальной дозы животным вводили 20 мг/кг через день в течение всего времени эксперимента (25 дней обработки). Объем опухолей и значения T/C рассчитывали согласно подробно описанному выше методу.

Пример 18. ФД-анализы *in vivo* фосфо-Акт (S473)

Примерно 50 мм³ замороженной ткани опухоли (например, BT-474 или VxPC-3) подвергали оттаиванию на льду и в каждый образец добавляли 100-300 мкл T-PER-буфера (фирма Pierce), содержащего ингибиторы фосфатазы (фирма Roche) и протеазы (фирма Roche). Объем добавляемого буфера для лизиса зависел от размера образца опухоли. Ткань разрушали с помощью 1,5-миллилитрового пестика (фирма Fisher Scientific) и полученные суспензии инкубировали на льду в течение 15 мин, после чего замораживали в течение ночи при -80°C. Образцы подвергали оттаиванию и центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g, 4°C, после чего измеряли в супернатанте концентрацию белка с помощью BCA-анализа (фирма Thermo Scientific). Супернатанты тканей разводили лизирующим буфером (фирма Mesoscale Discovery) и добавляли по 25 мкг в многоточечный 96-луночный планшет из углеродного материала для анализа фосфо-Акт (фирма Mesoscale Discovery), который предварительно блокировали с помощью блокирующего раствора-A (фирма Mesoscale Discovery). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при встряхивании, после чего лизат аспирировали и лунки отмывали 4 раза отмывочным Трис-буфером (фирма Mesoscale Discovery). Фосфорилированную Акт выявляли с помощью 25 мкл меченого с помощью сульфо-метки антитела к фосфо-Акт (S473) (фирма Mesoscale Discovery), разведенного в буфере для разведения, путем инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки отмывали 4 раза отмывочным Трис-буфером, после чего добавляли 150 мкл Т-буфера для

считывания (с сурфактантом) (фирма Mesoscale Discovery) и количественно оценивали сигналы с помощью визуализирующего устройства Mesoscale Sector.

Пример 19. ФД-анализы *in vivo* фосфо- HER3 (Y1197)

Примерно 50 мм замороженной ткани опухоли (например, ВХРС-3) подвергали оттаиванию на льду и в каждый образец добавляли 100- 300 мкл Т-PER-буфера (фирма Pierce), содержащего ингибиторы фосфатазы (фирма Roche) и протеазы (фирма Roche). Объем добавляемого буфера для лизиса зависел от размера образца опухоли. Ткань разрушали с помощью 1,5-миллилитрового пестика (фирма Fisher Scientific) и полученные суспензии инкубировали на льду в течение 15 мин, после чего замораживали в течение ночи при -80°C . Образцы подвергали оттаиванию и центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g, 4°C , после чего измеряли в супернатанте концентрацию белка с помощью ВСА-анализа (фирма Thermo Scientific). Супернатанты тканей разводили лизирующим буфером (фирма Mesoscale Discovery) и добавляли по 150 мкг в многоточечный 96-луночный планшет из углеродного материала (фирма Mesoscale Discovery), который предварительно сенсibiliзировали в течение ночи 4 мкг/мл антитела MAB3481 (фирма R&D Systems) и блокировали 3% молока. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании, после чего лизат аспирировали и лунки отмывали 4 раза отмывочным Трис-буфером (фирма Mesoscale Discovery). Фосфорилированный HER3 связывали с помощью антитела к HER3 pY1197, разведенного в соотношении 1/8000 в блокирующем буфере. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч лунки отмывали отмывочным Трис-буфером и антитело к pY1197 выявляли с использованием меченного с помощью S-метки антикриличьего антитела (фирма Mesoscale Discovery), разведенного в соотношении 1/1000 блокирующим буфером, путем инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки отмывали 4 раза отмывочным Трис-буфером, после чего добавляли 150 мкл разведенного в соотношении 1/4 Т-буфера для считывания (с сурфактантом) (фирма Mesoscale Discovery) и количественно оценивали сигналы с помощью визуализирующего устройства.

Пример 20. Изучение *in vitro* комбинации лекарственных средств

Для оценки возможности сочетания антител, мишенью которых является HER3, с терапевтическими средствами направленного действия, объединяли MOR09825 или MOR10703 с трастузумабом, лапатинибом, BEZ235, ВКМ120, BYL719, RAD001, эрлотинибом и цетуксимабом и осуществляли анализы жизнеспособности клеток. Примерно 1000-1500 клеток линий SK-Bр-3 (среда МакКоя), MDA-MB-453 (среда RPMI), FaDu (среда EMEM) или L3.3 (среда RPMI) высевали в 384-луночные планшеты с соответствующими культуральными средами, дополненными 2% FBS, и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C . Затем в лунки добавляли соответствующие комбинации лекарственных средств (как правило, конечные концентрации лекарственных средств составляли: для лапатиниба, ВКМ120 и BYL719 от 3 мкМ до 13 нМ; для RAD001 от 27 до 0,0041 нМ; для эрлотиниба от 1 мкМ до 0,0025 нМ; для MOR1073 от 100 до 0,01 нМ; для цетуксимаба от 100 до 0,0015 нМ; и для трастузумаба от 300 до 0,046 нМ), так, чтобы в каждом планшете лекарственные средства присутствовали в концентрациях, позволяющих построить кривую дозовой зависимости для каждого лекарственного средства в двухмерной матрице. Планшеты возвращали в инкубатор, где их выдерживали в течение 3-6 дней, после чего оценивали жизнеспособность клеток с помощью набора CellTiter-Glo (фирма Promega). Добавляли в каждую лунку раствор CellTiter-Glo и инкубировали при комнатной температуре при осторожном встряхивании в течение 10 мин. Уровень люминесценции определяли с помощью планшет-ридера SpectraMax (фирма Molecular Devices). Рассчитывали степень ингибирования роста при применении каждой комбинации и оценивали активность комбинации с помощью модели аддитивного действия Лёве.

Пример 21. Изучение *in vivo* комбинации лекарственных средств на клетках линии L3.3

Клетки поджелудочной железы линии L3.3 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной бычьей сыворотки, до момента имплантации. Самкам "голых" мышей линии Foxn1 (фирма Harlan Laboratories) имплантировали подкожно 3×10^6 клеток в не содержащей FBS среде DMEM. Общий инъекционный объем, содержащий клетки в суспензии, составлял 100 мкл. Через 12 дней после имплантации клеток животных, средний объем опухолей, у которых в каждой группе достигал примерно 100 мм^3 , включали в опыт по исследованию эффективности. Всего в опытах по исследованию эффективности использовали по 8 животных на группу.

Животных не включали в опыт, если у них были обнаружены необычные характеристики роста опухолей перед включением в опыт.

Животным вводили внутривенно MOR10703 путем инъекции в латеральную хвостовую вену дозы 20 мг/кг через день в течение всего времени эксперимента (обработка в течение 14 дней). Эрлотиниб применяли в дозе 50 мг/кг (РО) ежедневно в качестве индивидуального средства или в комбинации с MOR10703. Объем опухолей и величины Т/С рассчитывали согласно подробно описанному выше методу.

Результаты и их обсуждение

В целом, полученные результаты свидетельствуют о создании класса антител, которые связываются с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 конформационного эпитопа HER3 и стабилизируют HER3 в неактивной или закрытой конформации. Связывание указанных антител ингибирует как зави-

симую от лиганда, так и независимую от лиганда передачу сигнала. Эти антитела обладают также способностью связываться одновременно с лигандом HER3.

(I) Определение аффинности

Аффинность антител определяли на основе титрования уравновешенного раствора (SET) согласно описанному выше методу. Результаты обобщены в табл. 9 и пример кривых титрования для MOR10701 представлен на фиг. 1. Данные свидетельствуют о том, что идентифицирован ряд антител, которые отличаются выраженной способностью к связыванию с HER3 человека, обезьяны циномогус, крысы и мыши.

Таблица 9. Значения K_D антител к HER3 IgG-типа по данным титрования уравновешенного раствора (SET). Hu (человеческий), Cy (циномолгус), Mu (мышинный) и Ra (крысинный)

| MOR№ | SET K_D (нМ) | | | |
|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | hu HER3-метка | Cy HER3-метка | mu HER3-метка | ra HER3-метка |
| 09823 | 9 | 4 | 2 | 11 |
| 09824 | 3 | 3 | 2 | 7 |
| 09825 | 25 | 56 | 24 | 96 |
| 09974 | 350 | 200 | 120 | n.d. |
| 10701 | 4 | 4 | 6 | 10 |
| 10702 | 3 | 3 | 5 | 6 |
| 10703 | 26 | 23 | 20 | 40 |
| 12609 | 10 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 12610 | 37 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10703 N52S | 57 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10703 N52G | 60 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10703 A50V N52S | 16 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10703 A50V N52G | 22 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10701 R55G | 18 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10701 R55K | 11 | n.d. | n.d. | n.d. |

(II) Определение значений EC_{50} для клеток линии SK-Br-3

Способность идентифицированных антител связываться с экспрессирующими HER3 клетками оценивали, рассчитывая значения EC_{50} , характеризующие связывание с амплифицирующей HER2 линией клеток SK-Br-3 (см. фиг. 2 и табл. 10).

Таблица 10. Определенные с помощью FACS значения EC_{50} антител к HER3 IgG-типа для клеток линии SK-Br-3. (n.d. обозначает: не определяли)

| MOR № | SK-Br-3 FACS EC_{50} (нМ) |
|-------|-----------------------------|
| 09823 | 630 |
| 09824 | 324 |
| 09825 | 839 |
| 09974 | n.d. |
| 10701 | n.d. |
| 10702 | n.d. |
| 10703 | 2454 |

(III) Связывание с доменами HER3

Поднабор антител к HER3 характеризовали с помощью ELISA-анализа по их способности связываться с различными внеклеточными доменами человеческого HER3. Для этой цели внеклеточный домен HER3 подразделяли на его 4 конститутивных домена, и различные комбинации этих доменов клонировали, экспрессировали и очищали в зависимости от белков согласно описанному выше методу. С помощью указанной стратегии были созданы следующие домены в виде растворимых белков: домены 1 и 2 (D1-2), домен 2 (D2), домены 3 и 4 (D3-4) и домен 4 (D4). Ряд созданных при создании изобретения мышинных антител к человеческому HER3 (8D7, 1F5 и 8P2) оценивали также в качестве положительных контролей для демонстрации целостности выделенного домена.

Как продемонстрировано на фиг. 3, и MOR09823, и MOR09825 успешно связываются с внеклеточным доменом HER3, но в этом анализе с использованием указанных антител обнаружено их слабое связывание с выделенными доменами. Есть несколько возможных объяснений такой картины связывания:

а) MOR09823 и MOR09825 могут связываться с линейным эпитопом, который простирается в микроокружение домена, таким образом, частично связывание эпитопа может теряться, когда домены экспрессируют в виде выделенных белков;

б) MOR09823 и MOR09825 могут связываться с нелинейным эпитопом, в котором связаны несколько доменов. Следовательно, разделение HER3 на составляющие его единичные структуры может разрушать сайт связывания;

в) форма/конформация HER3 может представлять собой элемент связывания MOR09823 и

MOR09825 с HER3, так что только полноразмерный внеклеточный домен HER3 обладает способностью адаптировать эту форму/конформацию, в то время как выделенные домены не могут полностью принять эту конформацию.

(VI) Эпитопное картирование HER3 с помощью масс-спектрометрического определения обмена водорода на дейтерий

Эпитоп HER3 исследовали также с помощью HDX-MS-анализа ECD HER3 в присутствии версий Fab MOR09823, MOR09824, MOR09825 и MOR09974 и без них. На фиг. 4А продемонстрировано, что в отсутствие связанного Fab примерно 69% последовательности ECD HER3 перекрывается по меньшей мере одним пептидом. Брешы в покрытии могут являться результатом гликозилирования остатков в этих областях или недостаточным восстановлением дисульфидных связей в богатых цистеином областях, что, в частности, обнаружено в домене 2. Важно отметить, что хотя для каждого Fab характерны индивидуальные схемы защиты, одна область сильной защиты обнаружена во всех MOR09823, MOR09824, MOR09825 и MOR09974 (см. фиг. 4Б), что свидетельствует о том, что это семейство отличающихся высоким сходством антител связывается с HER3 идентичным образом. Наиболее сильная защита обнаружена для остатков 269-286 домена 2 (TFQLEPNPHTKYQYGGVC) (SEQ ID NO: 146), что свидетельствует о том, что остатки в этой области могут быть важными для связывания с МАТ. Картирование защищенных остатков Fab в опубликованной кристаллической структуре HER3 (Cho и Leahy, Science 297, 2002, сс. 1330-1333) продемонстрировало, что остатки 269-286 находится в функционально важной петле β-шпильки в домене 2 или вблизи нее (см. фиг. 4В).

(VII) Кристаллическая структура HER3/MOR09823

Исследование с разрешением 3,2Å кристаллической структуры в рентгеновских лучах Fab-фрагмента MOR09823, связанного с внеклеточным доменом HER3, позволило получить дополнительные данные о эпитопе HER3, распознаваемом семейством родственных антител (см. фиг. 5А). Кроме того, определяли с разрешением 3,4Å структуру Fab-фрагмента MOR09825, связанного с человеческим HER3. В кристаллических структурах обоих комплексов MOR09823/HER3 и MOR09825/HER3 HER3 находится в связанной (неактивной) конформации (см. фиг. 5А, Б, В и Г). Эта конформация характеризуется выраженной областью контакта, в которой происходит взаимодействие между доменами 2 и 4, опосредованное петлей димеризации β-шпильки в домене 2. Обнаруженная конформация HER3 сходна с описанной ранее у Cho с соавторами (Cho и Leahy, Science 297, 2002, сс. 1330-1333), опубликовавшими данные о кристаллической структуре внеклеточного домена HER3 в отсутствие нейрегулина. Поскольку нейрегулин может активировать HER3, то связанная конформация HER3, вероятно, должна быть неактивной. Сходные связанные конформации обнаружены также при кристаллизации представителей родственного семейства EGFR HER4 (Bouyain и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 2005, сс. 15024-15029) и HER1 (Ferguson и др., Molec. Cell 11, 2003, сс. 507-517).

Пространственные взаимодействия между доменами 1-4 HER3 в неактивном ("скованном") состоянии сильно отличаются от взаимодействий в вытянутом (активном) состоянии. Эти данные базируются на кристаллических структурах представителей родственного семейства EGFR HER2 и связанного с лигандом HER1 (Cho и др., Nature 421, 2003, сс. 756-760; Ogiso и др., Cell 110, 2002, сс. 775-787; Garrett и др., Cell 110, 2002, сс. 763-773), которые оба находились в вытянутом (активном) состоянии. В вытянутом состоянии петля димеризации β-шпильки домена 2 освобождается от ингибирующего его взаимодействия с доменом 4 и в результате становится свободной для взаимодействия с белками-партнерами по димеризации. Таким образом, петля димеризации β-шпильки домена 2 является функционально важной как для поддержания связанного (неактивного) состояния, так и для опосредования димеризации EGF-рецепторов в вытянутом состоянии, что приводит к активации внутриклеточного киназного домена. Таким образом, кристаллические структуры комплексов MOR09823/HER3 и MOR09825/HER3 (см. фиг. 5) позволяет предположить, что и MOR09823, и MOR09825 функционируют, стабилизируя неактивную конформацию HER3.

Кристаллическая структура свидетельствует также о том, что эпитоп HER3, распознаваемый и MOR09823 и MOR09825, представляет собой нелинейный эпитоп, который включает остатки из обоих доменов 2 и 4 (см. фиг. 5В и 5Г, табл. 11, 12, 13 и 14). Таким образом, эпитоп HER3, распознаваемый антителами из этого семейства родственных антител, можно описать как:

домен 2: остатки 265-277, 315,

домен 4: остатки 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615.

Следовательно, связывание обоих доменов 2 и 4 с MOR09823 или MOR09825 должно стабилизировать связанную конформацию HER3, что приводит к антагонистическому действию способности передавать сигнал.

Механизм связывания MOR09823/MOR09825, обнаруженный при изучении кристаллической структуры, согласуется с проведенными при создании изобретения исследованиями по эпитопному картированию. В частности, осуществленные с помощью ELISA эксперименты по изучению связывания доменов продемонстрировали, что аффинность MOR09823 и MOR09825 существенно выше в отношении интактного внеклеточного белка HER3, чем в отношении выделенных доменов (например, D1-, D1-D2-,

D3- или D3-D4-фрагментов) (см. фиг. 3). Это согласуется также с оценкой HER3 с помощью метода HDX-MS (см. фиг. 4Б), который позволил идентифицировать β -шпильку домена 2 в качестве части распознаваемого антителом эпитопа. И, наконец, обе кристаллические структуры демонстрируют, что лигандсвязывающая поверхность HER3, которая была картирована по аналогии с доменами 1 и 3 HER1 (Ogiso и др., Cell, 110, 2002, сс. 775-787; Garrett и др., Cell, 110, 2002, сс. 763-773), не закрывается при связывании с MOR09823 или с MOR09825 (см. фиг. 5Б). Это согласуется с полученными при создании изобретения данными о том, что ни MOR09823, ни MOR09825 не блокируют связывание нейрегулина с MCF7-клетками (см. фиг. 9), и что комплексы HER3/MOR09823 могут связываться с иммобилизованным нейрегулином по данным Вiasoge-анализа (см. фиг. 10).

Таблица 11. Взаимодействия между тяжелой цепью Fab MOR09823 и человеческим HER3. Остатки VH Fab пронумерованы в соответствии с линейной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 15). HER3-остатки пронумерованы в соответствии с NP_001973. Представлены HER3-остатки, которые имеют по меньшей мере один атом в пределах 5Å от атома Fab MOR09823

| Fab MOR09823 | | | Человеческий HER3 | | |
|--------------|-------|------|-------------------|-------|-------|
| Остаток | Номер | Цепь | Остаток | Номер | Домен |
| Ser | 30 | VH | Pro | 276 | 2 |
| Ser | 31 | VH | Pro | 274 | 2 |
| | | | Asn | 275 | 2 |
| | | | Pro | 276 | 2 |
| Tyr | 32 | VH | Pro | 276 | 2 |
| | | | His | 277 | 2 |
| Ala | 33 | VH | Asn | 266 | 2 |
| | | | Leu | 268 | 2 |
| Ser | 35 | VH | Leu | 268 | 2 |
| Val | 50 | VH | Leu | 268 | 2 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| Gly | 52 | VH | Glu | 273 | 2 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| Ala | 53 | VH | Glu | 273 | 2 |
| | | | Pro | 274 | 2 |
| Val | 54 | VH | Glu | 273 | 2 |
| Tyr | 58 | VH | Pro | 583 | 4 |
| | | | Asp | 571 | 4 |
| | | | His | 584 | 4 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| | | | Gln | 271 | 2 |
| Asn | 73 | VH | Asn | 315 | 2 |
| Ser | 74 | VH | Asn | 315 | 2 |
| Trp | 98 | VH | Leu | 268 | 2 |
| | | | Lys | 267 | 2 |
| | | | Asn | 266 | 2 |
| Asp | 100 | VH | Ala | 596 | 4 |
| | | | Lys | 597 | 4 |
| | | | Pro | 276 | 2 |
| | | | His | 277 | 2 |
| Glu | 101 | VH | Lys | 267 | 2 |
| | | | Lys | 597 | 4 |
| Phe | 103 | VH | Leu | 268 | 2 |

Таблица 12. Взаимодействия между легкой цепью Fab MOR09823 и человеческим HER3. Остатки VL Fab пронумерованы в соответствии с линейной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 14). HER3-остатки пронумерованы в соответствии с NP_001973. Представлены HER3-остатки, которые имеют по меньшей мере один атом, находящийся в пределах 5Å от атома Fab MOR09823

| Fab MOR09823 | | | Человеческий HER3 | | |
|--------------|-------|------|-------------------|-------|-------|
| Остаток | Номер | Цепь | Остаток | Номер | Домен |
| Gln | 27 | VL | Arg | 611 | 4 |
| | | | Glu | 609 | 4 |
| Gly | 28 | VL | Arg | 611 | 4 |

| | | | | | |
|-----|----|----|-----|-----|---|
| | | | Pro | 612 | 4 |
| Ile | 29 | VL | Pro | 612 | 4 |
| Ser | 30 | VL | Pro | 612 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| | | | His | 614 | 4 |
| | | | Glu | 615 | 4 |
| Asn | 31 | VL | Glu | 615 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| Trp | 32 | VL | Lys | 267 | 2 |
| | | | Tyr | 265 | 2 |
| | | | Pro | 612 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| | | | Ile | 600 | 4 |
| | | | Lys | 602 | 4 |
| Tyr | 49 | VL | Lys | 597 | 4 |
| Gly | 66 | VL | Glu | 615 | 4 |
| Ser | 67 | VL | His | 614 | 4 |
| | | | Glu | 615 | 4 |
| Gln | 89 | VL | Leu | 268 | 2 |
| Tyr | 91 | VL | Lys | 267 | 2 |
| | | | Leu | 268 | 2 |
| | | | Phe | 270 | 2 |
| | | | | | |
| Ser | 92 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Lys | 602 | 4 |
| | | | Pro | 612 | 4 |
| Ser | 93 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Glu | 609 | 4 |
| Phe | 94 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Leu | 268 | 2 |
| | | | Gly | 582 | 4 |
| | | | Pro | 583 | 4 |
| Thr | 96 | VL | Leu | 268 | 2 |

Таблица 13. Взаимодействия между тяжелой цепью Fab MOR09825 и человеческим HER3. Остатки VH Fab пронумерованы в соответствии с линейной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 51). HER3-остатки пронумерованы в соответствии с NP_001973. Представлены HER3-остатки, которые имеют по меньшей мере один атом, находящийся в пределах 5 Å от атома Fab MOR09825

| Fab MOR09825 | | | Человеческий HER3 | | |
|--------------|-------|------|-------------------|-------|-------|
| Остаток | Номер | Цепь | Остаток | Номер | Домен |
| Ser | 30 | VH | Asn | 315 | 2 |
| Ser | 31 | VH | Pro | 274 | 2 |
| | | | Pro | 276 | 2 |
| Tyr | 32 | VH | Pro | 276 | 2 |
| | | | His | 277 | 2 |
| Ala | 33 | VH | Asn | 266 | 2 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| Ser | 35 | VH | Leu | 268 | 2 |

| | | | | | |
|-----|-----|----|-----|-----|---|
| Trp | 47 | VH | Leu | 268 | 2 |
| Ala | 50 | VH | Leu | 268 | 2 |
| Asn | 52 | VH | Glu | 273 | 2 |
| | | | Gln | 271 | 2 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| Ser | 53 | VH | Glu | 273 | 2 |
| | | | Pro | 274 | 2 |
| Gln | 54 | VH | Glu | 273 | 2 |
| | | | Pro | 274 | 2 |
| Ser | 57 | VH | Gln | 271 | 2 |
| Tyr | 59 | VH | Pro | 583 | 4 |
| | | | Asp | 571 | 4 |
| | | | His | 584 | 4 |
| | | | Thr | 269 | 2 |
| Asn | 74 | VH | Gln | 271 | 2 |
| | | | Asn | 315 | 2 |
| Trp | 99 | VH | Leu | 268 | 2 |
| | | | Lys | 267 | 2 |
| | | | Asn | 266 | 2 |
| Asp | 101 | VH | Ala | 596 | 4 |
| | | | Lys | 597 | 4 |
| | | | Pro | 276 | 2 |
| | | | His | 277 | 2 |
| Glu | 102 | VH | Lys | 267 | 2 |
| | | | Lys | 597 | 4 |
| Phe | 104 | VH | Leu | 268 | 2 |

Таблица 14. Взаимодействия между легкой цепью Fab MOR09825 и человеческим HER3. Остатки VL Fab пронумерованы в соответствии с линейной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 50). HER3-остатки пронумерованы в соответствии с NP_001973. Представлены HER3-остатки, которые имеют по меньшей мере один атом, находящийся в пределах 5Å от атома Fab MOR09825

| Fab MOR09825 | | | Человеческий HER3 | | |
|--------------|-------|------|-------------------|-------|-------|
| Остаток | Номер | Цепь | Остаток | Номер | Домен |
| Gln | 27 | VL | Arg | 611 | 4 |
| Gly | 28 | VL | Arg | 611 | 4 |
| | | | Pro | 612 | 4 |
| Ile | 29 | VL | Pro | 612 | 4 |
| Ser | 30 | VL | Pro | 612 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| | | | His | 614 | 4 |
| | | | Glu | 615 | 4 |
| Asn | 31 | VL | Glu | 615 | 4 |
| | | | His | 614 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| Trp | 32 | VL | Lys | 267 | 2 |
| | | | Tyr | 265 | 2 |
| | | | Pro | 612 | 4 |
| | | | Cys | 613 | 4 |
| | | | Ile | 600 | 4 |

| | | | | | |
|-----|----|----|-----|-----|---|
| | | | Lys | 602 | 4 |
| Tyr | 49 | VL | Lys | 597 | 4 |
| Gly | 66 | VL | Glu | 615 | 4 |
| Ser | 67 | VL | His | 614 | 4 |
| | | | Glu | 615 | 4 |
| Gln | 89 | VL | Leu | 268 | 2 |
| Tyr | 91 | VL | Lys | 267 | 2 |
| | | | Leu | 268 | 2 |
| | | | Phe | 270 | 2 |
| Ser | 92 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Lys | 602 | 4 |
| | | | Pro | 612 | 4 |
| | | | Arg | 611 | 4 |
| Ser | 93 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Glu | 609 | 4 |
| Phe | 94 | VL | Phe | 270 | 2 |
| | | | Gly | 582 | 4 |
| | | | Pro | 583 | 4 |
| Thr | 96 | VL | Leu | 268 | 2 |

Визуальная оценка кристаллических структур MOR09823/MOR09825 продемонстрировала, что остатки HER3 Lys267 и Leu268 участвуют в многочисленных взаимодействиях с различными CDR антител, что позволяет предположить, что они могут быть важны для связывания с антителом. Поэтому Lys267 и/или Leu268 заменяли на аланин, экспрессировали и полученные рекомбинантные белки очищали для оценки их влияния на связывание с антителом. Анализы по оценке связывания, проведенные с помощью ELISA, продемонстрировали, что мутация либо Lys267, либо Leu268 элиминировала связывание MOR10703 с HER3 (фиг. 5E), что позволяет предположить, что оба остатка представляют собой интегральную часть эпитопа HER3 и, вероятно, вносят вклад во взаимодействия между MOR09823/MOR09825 и HER3.

(VIII) Ингибирование передачи сигнала в клетке

Для оценки воздействия антител к HER3 на зависящую от лиганда активность HER3 клетки линии MCF7 инкубировали с IgG перед стимуляцией нейрегулином. Пример кривых ингибирования проиллюстрирован на фиг. 6А, и данные обобщены в табл. 15. Исследовали также воздействие антител к HER3 на опосредуемую HER2 активацию HER3 с использованием клеточной линии SK-Br-3, в которой происходит амплификация HER2 (фиг. 6Б и табл. 15).

Таблица 15. Значения IC₅₀ для pHER3 и степень ингибирования антителом к HER3 IgG-типа в клетках линий MCF7 и SK-Br-3

| MOR | MCF7 pHER3 | | SK-Br-3 pHER3 | |
|-------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| № | IC ₅₀ (пМ) | % ингибирования | IC ₅₀ (пМ) | % ингибирования |
| 09823 | 181 | 89 | 56 | 59 |
| 09824 | 103 | 91 | 110 | 64 |
| 09825 | 399 | 80 | 169 | 66 |
| 09974 | 3066 | 69 | 1928 | 67 |
| 10701 | n.d. | n.d. | 370 | 74 |
| 10702 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10703 | 333 | 80 | 167 | 69 |
| 12609 | 5 | 86 | 241 | 71 |
| 12610 | 126 | 84 | 192 | 75 |

Для решения вопроса о том, влияет ли ингибирование активности HER3 на киназу Akt, расположенную в прямой направлении пути передачи сигнала в клетке, ее фосфорилирование оценивали также в клетках, амплифицирующих HER2, после обработки антителами к HER3 (см. фиг. 7 и табл. 16).

Таблица 16. Значения IC₅₀ для pAkt (S⁴⁷³) и степень ингибирования антителом к HER3 IgG-типа в клетках линий SK-Bр-3, BT-474 и MCF7

| MOR № | SK-Bр-3 pAkt | | BT-474 pAkt | MCF7 pAkt | |
|-------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| | IC ₅₀ (пМ) | % ингибирования | % ингибирования | IC ₅₀ (пМ) | % ингибирования |
| 09823 | 55 | 92 | 57 | n.d. | n.d. |
| 09824 | 62 | 93 | 46 | n.d. | n.d. |
| 09825 | 156 | 91 | 69 | 294 | 79 |
| 09974 | 814 | 85 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 10701 | n.d. | n.d. | 59 | n.d. | n.d. |
| 10702 | n.d. | n.d. | 55 | n.d. | n.d. |
| 10703 | 70 | 89 | 62 | 449 | 79 |

В целом, установлено, что каждое из антител MOR09823, MOR09824, MOR09825, MOR09974, MOR10701, MOR10702, MOR10703, MOR12609 и MOR12610 обладает способностью ингибировать клеточную активность HER3 как зависимым от лиганда, так и независимым от лиганда образом.

(IX) Ингибирование пролиферации

Поскольку все антитела MOR09823, MOR09824, MOR09825, MOR09974, MOR10701, MOR10702 и MOR10703 ингибируют активность HER3 и передачу сигнала в прямом направлении, изучали их способность блокировать зависимый и независимый от лиганда рост клеток *in vitro* (приведенные в качестве примера данные представлены на фиг. 8 и обобщены в табл. 17). Все изученные антитела к HER3 эффективно ингибировали клеточную пролиферацию.

Таблица 17. Ингибирование пролиферации после обработки взятыми в дозе 10 мкг/мл антителами к HER3 IgG-типа клеток линий SK-Bр-3, BT-474 и MCF7.

| MOR № | % Ингибирования | | |
|-------|-----------------|--------|------|
| | SK-Bр-3 | BT-474 | MCF7 |
| 09823 | 39 | 39,8 | 82 |
| 09824 | 33 | 36,8 | 82 |
| 09825 | 41 | 37,2 | 63 |
| 09974 | 35 | n.d. | 20 |
| 10701 | n.d. | 43,6 | n.d. |
| 10702 | n.d. | 43,8 | n.d. |
| 10703 | 35 | 41,6 | 81 |

(X) Оценки блокады лиганда

Способность описанных антител к HER3 блокировать связывание лиганда исследовали, оценивая связывание нейрегулина с клетками линии MCF7, предварительно обработанными либо MOR09823, либо MOR09825. Присутствие как MOR09823, так и MOR09825 не оказывало существенного воздействия на способность нейрегулина связываться с MCF7-клетками, в то время как применяемое в этом эксперименте в качестве положительного контроля антитело (Mab3481) обладало способностью заметно влиять на связывание нейрегулина (см. фиг. 9). Эти результаты согласуются с данными о кристаллической структуре, из которых следует, что MOR09823 взаимодействует с доменами 2 и 4, в то время как основные точки контакта при взаимодействии HER3 с нейрегулином, как предполагается, сгруппированы в основном в доменах 1 и 3. С учетом того, что нейрегулин обладает способностью связываться с неактивной конформацией HER3 (Kani и др., *Biochemistry* 44, 2005, сс. 15842-15857), возможно, что MOR09823 и MOR09825 функционируют, предупреждая перегруппировку доменов HER3, необходимую для передачи сигнала, или оказывая воздействие на димеризацию рецептора.

(XI) Оценка блокады лиганда (биохимическая)

Для решения вопроса о том, могут ли MOR09823 и нейрегулин одновременно связываться с HER3, проводили биохимический анализ с использованием Viacore™-технологии. Анализы взаимодействия осуществляли путем иммобилизации биотинилированного нейрегулина на поверхности сенсорного чипа CAP (фирма GE Healthcare), применяемого в Viacore™, используя набор Biotin CAPture (фирма GE Healthcare). Получали комплексы HER с антителами путем инкубации человеческого HER3-Fc с взятыми в возрастающих концентрациях MOR09823, 105.5 (фирма Thermo Scientific) или человеческим IgG. Предварительно полученные комплексы HER3/антитело инъецировали на референс-поверхность и активную поверхность и оценивали взаимодействие HER3 с нейрегулином.

Контрольный IgG не оказывал воздействия на формирование комплекса HER3/нейрегулин, в то время как антитело 105.5 существенно ингибировало способность HER3 связываться с нейрегулином, что согласуется с известными сведениями о том, что оно представляет собой блокирующее лиганд антитело (фиг. 10). В отличие от этого при образовании комплексов HER3/MOR09823 имело место связывание нейрегулина, что демонстрирует, что MOR09823 не препятствует связыванию лиганда. Важно отметить уникальное зависящее от дозы увеличение значений RU при инъекции комплексов MOR09823/HER3. Эти данные свидетельствуют об образовании на поверхности чипа тримерного комплекса, содержащего нейрегулин, HER3 и MOR09823. Возможность образования этого тримерного ком-

плекса предсказано по кристаллической структуре HER3/MOR09823, поскольку связывание MOR09823 не закрывает сайт связывания лиганда на HER3, это позволяет предположить, что связывание нейрегулина и MOR09823 не являются взаимно исключаящими.

Согласно другому варианту осуществления изобретения антитело или его фрагмент связывается как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3 и не блокирует конкурентное связывание лиганда HER3, такого как нейрегулин. Не вдаваясь в теорию, можно предположить, что антитело или его фрагмент связывается как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, поддерживает HER3 в неактивной конформации, не блокируя сайт связывания лиганда на HER3. В результате лиганд HER3 (например, нейрегулин) может связываться с HER3 одновременно с антителом.

Антитела, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты ингибируют как зависимую от лиганда, так и независимую от лиганда активацию HER3, не препятствуя связыванию лиганда. Это рассматривается как преимущество по следующим причинам:

I) терапевтическое антитело может найти клиническое применение в отношении широкого спектра опухолей, чем антитело, направленное только на один механизм активации HER3 (т.е. зависимой от лиганда или независимой от лиганда), поскольку каждый механизм опосредует различные типы опухолей;

(II) терапевтическое антитело может обладать эффективностью в отношении разных типов опухолей, когда одновременно вовлечены оба механизма активации HER3. Антитело, направленное только на один механизм активации HER3 (т.е. зависимой от лиганда или независимой от лиганда), должно обладать меньшей эффективностью или не обладать эффективностью в отношении этих типов опухолей;

(III) на эффективность антитела, которое ингибирует зависимую от лиганда активацию HER3, не препятствуя при этом связыванию лиганда, с меньшей вероятностью будет оказывать вредное воздействие возрастающие концентрации лиганда. Это может приводить либо к повышенной эффективности в отношении типа опухоли, вызываемой очень высокими концентрациями лиганда HER3, либо к пониженной предрасположенности к развитию устойчивости к лекарственным средствам в том случае, когда устойчивость опосредована повышающей регуляцией лигандов HER3;

(IV) антитело, которое ингибирует активацию HER3 путем стабилизации неактивной формы, должно быть менее подвержено устойчивости к лекарственным средствам, связанными с альтернативными механизмами активации HER3.

Следовательно, антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения состояний, в отношении которых существующие в настоящее время терапевтические антитела являются клинически неэффективными.

(XII) Ингибирование *in vivo* активности HER3 и воздействие на рост опухолей

Для оценки активности *in vivo* описанных антител к HER3 антитело MOR09823 оценивали на моделях опухолей как ВхРС-3, так и ВТ-474. Установлено, что MOR09823 ингибирует активность HER3, о чем свидетельствует существенное снижение уровней pHER3 в опухолях (фиг. 11). Ингибируется также передача сигнала HER3 в прямом направлении, что продемонстрировано по снижению уровней pAkt как при использовании ВхРС-3, так и ВТ-474 (фиг. 11). В опыте по оценке опосредуемой HER3 эффективности при использовании ВТ-474, установлено, что повторная обработка MOR10701 приводила к ингибированию на 74% роста опухолей (см. фиг. 12А), а обработка MOR10703 приводила к ингибированию на 83%. При изучении роста опухолей на модели ВхРС3 установлено, что и MOR10701, и MOR10703 очень эффективно ингибировали опосредуемый лигандом рост опухолей (см. фиг. 13).

(XIII) Изучение *in vitro* комбинаций лекарственных средств и их воздействие на рост клеток

Поскольку рост опухолевых клеток часто запускается несколькими путями передачи сигнала, исследовали, обладают ли комбинации MOR09823 или MOR10703 с различными средствами целенаправленного воздействия благоприятным действием в отношении блокады клеточной пролиферации. Выбранные средства целенаправленного действия ингибируют главным образом HER2 (трастузумаб, лапатиниб), EGFR (цетуксимаб, эрлотиниб), PI3K/mTOR (BEZ235), PI3K (BKM120), PI3CA (BYL719) и mTOR (RAD001), поскольку эти мишени, как правило, активируются в человеческих опухолях. Анализ изоболограмм (см. фиг. 14) продемонстрировал, что для MOR09823 и MOR10703 характерно синергетическое действие при их применении в комбинациях с трастузумабом, лапатинибом, эрлотинибом, цетуксимабом, BEZ235, BKM120, BYL719 и RAD001. Эти данные позволяют предположить, что ингибирование передачи сигнала HER3 является особенно благоприятным при применении ингибиторов, мишенью которых являются рецепторные тирозинкиназы или путь передачи сигнала PI3K.

(XIV) Изучение *in vivo* комбинаций лекарственных средств и MOR10703 Поскольку *in vitro* установлено наличие совместного действия ингибиторов HER3 со средствами, мишенью которых являются рецепторные тирозинкиназы, то при создании изобретения исследовали воздействие *in vivo*, применяя либо MOR10701, либо MOR10703 в сочетании с трастузумабом и эрлотинибом. Как установлено с использованием ксенотрансплантатов ВТ-474 (см. фиг. 15А), комбинация либо MOR10701, либо MOR10703 (20 мг/кг) с взятым в субоптимальной дозе (1 мг/кг) трастузумабом обладала действием, достаточным для индукции регресса опухолей (%T/C= -50 и -37 соответственно). При применении ксенотрансплантатов клеток рака поджелудочной железы L3.3 установлено, что комбинация MOR10703 (20 мг/кг) с применяемым ежедневно эрлотинибом (50 мг/кг) привела к стазу опухолей (%T/C= 3, см. фиг.

15Б). На обеих моделях установлено, что комбинация двух лекарственных средств обладала существенно более высокой эффективностью, чем индивидуальное применение любого из лекарственных средств, что подтверждает полученные ранее при создании изобретения данные *in vitro* о благоприятном действии комбинации антител, мишенью которых является HER3, с антителами, мишенью которых является ErbB.

В целом, можно сделать вывод о том, что уникальная способность этого семейства антител стабилизировать неактивную конформацию HER3 приводит к выраженной эффективности *in vivo* на моделях, в которых HER3 активируется либо зависимым, либо независимым от лиганда образом. Кроме того, ингибирование HER3 этим семейством антител оказывает благоприятное действие в комбинации с широким разнообразием целенаправленных терапий.

Включение в качестве ссылки

Все процитированные в настоящем описании ссылки, включая патенты, заявки на патент, статьи, руководства и т.п., а также ссылки, процитированные в указанных публикациях, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Эквиваленты

Приведенное описание изобретения рассматривается как достаточное для практического воплощения изобретения специалистом в данной области. Приведенное описание и примеры детализируют конкретные предпочтительные варианты осуществления изобретения и демонстрируют наилучший путь осуществления изобретения. Однако должно быть очевидно, что вне зависимости от того, насколько подробно оно было изложено выше в настоящем описании, изобретение можно осуществлять на практике многими путями, и изобретение следует трактовать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, включающий:

- а) VH, которая содержит SEQ ID NO: 15, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- б) VH, которая содержит SEQ ID NO: 33, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 32, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- в) VH, которая содержит SEQ ID NO: 51, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- г) VH, которая содержит SEQ ID NO: 69, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 68, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- д) VH, которая содержит SEQ ID NO: 87, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 86, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- е) VH, которая содержит SEQ ID NO: 105, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 104, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- ж) VH, которая содержит SEQ ID NO: 123, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 122, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- з) VH, которая содержит SEQ ID NO: 141, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 140, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- и) VH, которая содержит SEQ ID NO: 159, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 158, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- к) VH, которая содержит SEQ ID NO: 177, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 176, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- л) VH, которая содержит SEQ ID NO: 195, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 194, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- м) VH, которая содержит SEQ ID NO: 213, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 212, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- н) VH, которая содержит SEQ ID NO: 231, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 230, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- о) VH, которая содержит SEQ ID NO: 249, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 248, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- п) VH, которая содержит SEQ ID NO: 267, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 266, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- р) VH, которая содержит SEQ ID NO: 285, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 284, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- с) VH, которая содержит SEQ ID NO: 303, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 302, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- т) VH, которая содержит SEQ ID NO: 321, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 320, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или
- у) VH, которая содержит SEQ ID NO: 339, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 338, или аминокис-

лотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или

ф) VH, которая содержит SEQ ID NO: 357, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 356, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%; или

х) VH, которая содержит SEQ ID NO: 375, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 374, или аминокислотную последовательность, идентичную им на 97-99%.

2. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 493.

3. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, где антитело содержит последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 494.

4. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 493 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 494.

5. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, которое/который содержит:

а) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 2; CDR2 SEQ ID NO: 3; CDR3 SEQ ID NO: 4; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 5; CDR2 SEQ ID NO: 6; и CDR3 SEQ ID NO: 7; или

б) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 20; CDR2 SEQ ID NO: 21; CDR3 SEQ ID NO: 22; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 23; CDR2 SEQ ID NO: 24; и CDR3 SEQ ID NO: 25; или

в) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 38; CDR2 SEQ ID NO: 39; CDR3 SEQ ID NO: 40; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 41; CDR2 SEQ ID NO: 42; и CDR3 SEQ ID NO: 43 или

г) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 56; CDR2 SEQ ID NO: 57; CDR3 SEQ ID NO: 58; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 59; CDR2 SEQ ID NO: 60; и CDR3 SEQ ID NO: 61; или

д) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 74; CDR2 SEQ ID NO: 75; CDR3 SEQ ID NO: 76; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 77; CDR2 SEQ ID NO: 78; и CDR3 SEQ ID NO: 79; или

е) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 92; CDR2 SEQ ID NO: 93; CDR3 SEQ ID NO: 94; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 95; CDR2 SEQ ID NO: 96; и CDR3 SEQ ID NO: 97; или

ж) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 110; CDR2 SEQ ID NO: 111; CDR3 SEQ ID NO: 112; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 113; CDR2 SEQ ID NO: 114; и CDR3 SEQ ID NO: 115; или

з) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 128; CDR2 SEQ ID NO: 129; CDR3 SEQ ID NO: 130; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 131; CDR2 SEQ ID NO: 132; и CDR3 SEQ ID NO: 133; или

и) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 146; CDR2 SEQ ID NO: 147; CDR3 SEQ ID NO: 148; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 149; CDR2 SEQ ID NO: 150; и CDR3 SEQ ID NO: 151; или

к) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 164; CDR2 SEQ ID NO: 165; CDR3 SEQ ID NO: 166; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 167; CDR2 SEQ ID NO: 168; и CDR3 SEQ ID NO: 169; или

л) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 182; CDR2 SEQ ID NO: 183; CDR3 SEQ ID NO: 184; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 185; CDR2 SEQ ID NO: 186; и CDR3 CDR3 SEQ ID NO: 187; или

м) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 200; CDR2 SEQ ID NO: 201; CDR3 SEQ ID NO: 202; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 203; CDR2 SEQ ID NO: 204; и CDR3 SEQ ID NO: 205; или

н) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 218; CDR2 SEQ ID NO: 219; CDR3 SEQ ID NO: 220; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 221; CDR2 SEQ ID NO: 222; и CDR3 SEQ ID NO: 223; или

о) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 236; CDR2 SEQ ID NO: 237; CDR3 SEQ ID NO: 238; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 239; CDR2 SEQ ID NO: 240; и CDR3 SEQ ID NO: 241; или

п) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 254; CDR2 SEQ ID NO: 255; CDR3 SEQ ID NO: 256; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 257; CDR2 SEQ ID NO: 258; и CDR3 SEQ ID NO: 259; или

р) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 272; CDR2 SEQ ID NO: 273; CDR3 SEQ ID NO: 274; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 275; CDR2 SEQ ID NO: 276; и CDR3 SEQ ID NO: 277; или

с) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 290; CDR2 SEQ ID NO: 291; CDR3 SEQ

ID NO: 292; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 293; CDR2 SEQ ID NO: 294; и CDR3 SEQ ID NO: 295; или

т) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 308; CDR2 SEQ ID NO: 309; CDR3 SEQ ID NO: 310; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 311; CDR2 SEQ ID NO: 312; и CDR3 SEQ ID NO: 313; или

у) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 326; CDR2 SEQ ID NO: 327; CDR3 SEQ ID NO: 328; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 329; CDR2 SEQ ID NO: 330; и CDR3 SEQ ID NO: 331; или

ф) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 344; CDR2 SEQ ID NO: 345; CDR3 SEQ ID NO: 346; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 347; CDR2 SEQ ID NO: 348; и CDR3 SEQ ID NO: 349; или

х) в варибельной области тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 362; CDR2 SEQ ID NO: 363; CDR3 SEQ ID NO: 364; в варибельной области легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 365; CDR2 SEQ ID NO: 366; и CDR3 SEQ ID NO: 367.

6. Фрагмент антитела по одному из предыдущих пунктов, где фрагмент выбирается из группы, состоящей из Fab, F(ab₂)', F(ab)₂', scFv, VHH, VH, VL, dAb.

7. Фармацевтическая композиция для лечения рака, отличающегося экспрессией HER3, включающая антитело или фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Композиция по п.7, дополнительно содержащая терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора HER1, ингибитора HER2, ингибитора HER3, ингибитора HER4, ингибитора mTOR и ингибитора PI3-киназы.

9. Композиция по п.7, дополнительно содержащая терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора HER1, выбранного из группы, состоящей из матузумаба (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаба, Vertibix®/панитумумаба, mAb 806, нимотузумаба, Iressa®/гефитиниба, CI-1033 (PD183805), лапатиниба (GW-572016), Tykerb®/лапатиниба дитозилата, Tarceva®/эрлотиниба-HCl (OSI-774), PKI-166 и Tovok®; ингибитора HER2, выбранного из группы, состоящей из пертузумаба, трастузумаба, MM-111, нератиниба, лапатиниба или лапатиниба дитозилата/Tykerb®; ингибитора HER3, выбранного из группы, состоящей из MM-121, MM-111, IB4C3, 2DID12 (фирма U3 Pharma AG), AMG888 (фирма Amgen), AV-203 (фирма Aveo), MENH7945A (фирма Genentech) и малых молекул, которые ингибируют HER3; и ингибитора HER4.

10. Композиция по п.7, дополнительно содержащая терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора mTOR, выбранного из группы, состоящей из темсиролимуса/Torisel®, ридафоролимуса/дефоролимуса, AP23573, MK8669, эверолимуса/Affinitor®.

11. Композиция по п.8, дополнительно содержащая терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящий из ингибитора PI3-киназы, выбранного из группы, состоящей из GDC 0941, BEZ235, BMK120 и BYL719.

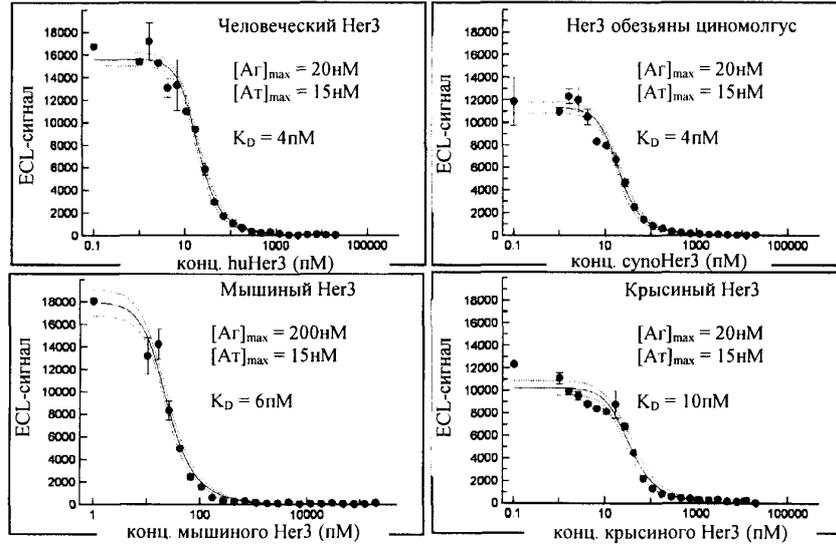
12. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6 для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, множественной миеломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, острого миелолейкоза, хронического миелолейкоза, остеосаркомы, плоскоклеточной карциномы, опухоли оболочки периферических нервов, шванномы, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, эзофагеального рака, глиобластомы, светлоклеточной саркомы мягкой ткани, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки и меланомы.

13. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6 для лечения рака молочной железы.

14. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, где рак выбирается из группы, состоящей из рака молочной железы, колоректального рака, рака легкого, множественной миеломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, острого миелолейкоза, хронического миелолейкоза, остеосаркомы, плоскоклеточной карциномы, опухоли оболочки периферических нервов, шванномы, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, эзофагеальный рака, глиобластомы, светлоклеточной саркомы мягкой ткани, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки и меланомы.

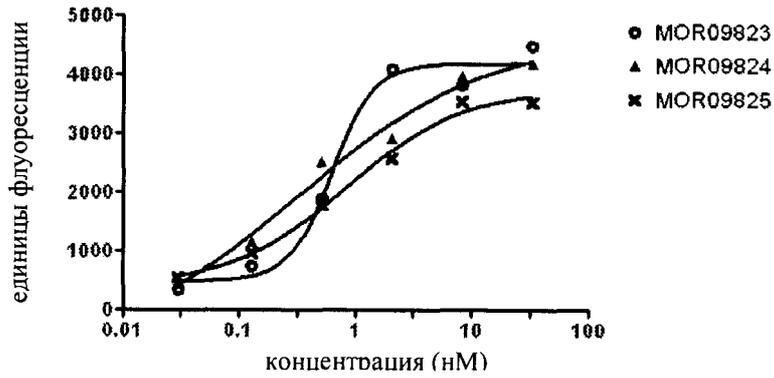
15. Выделенное моноклональное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, содержащее в варибельной области тяжелой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 128; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 129; CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 130; в варибельной области легкой цепи CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 131; CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 132; и CDR3 последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 133.

16. Выделенное антитело или его фрагмент к HER3-рецептору, включающее VH, содержащую SEQ ID NO: 141, и VL, содержащую SEQ ID NO: 140.



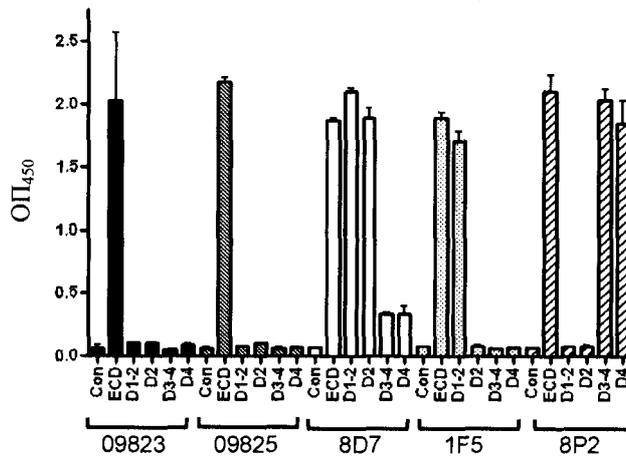
Фиг. 1

FACS-титрование SK-Bv-3

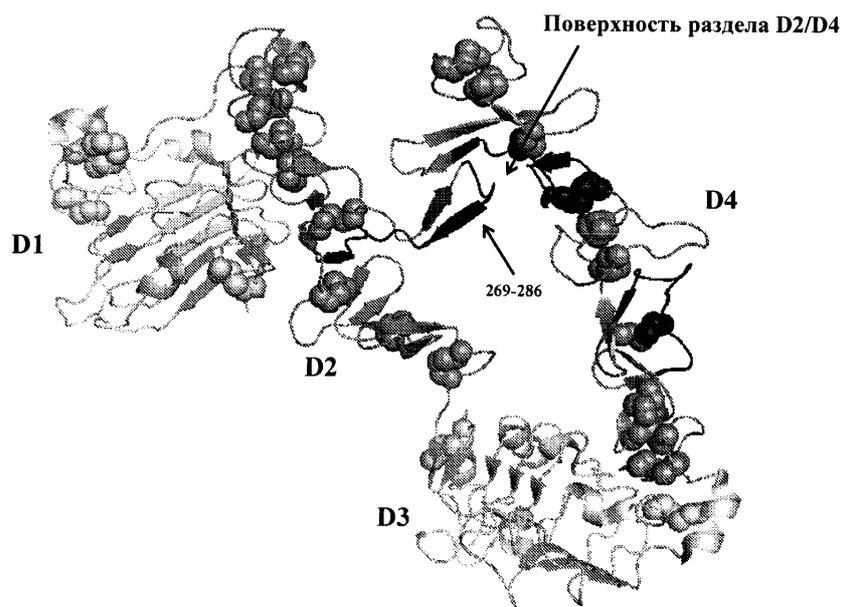


Фиг. 2

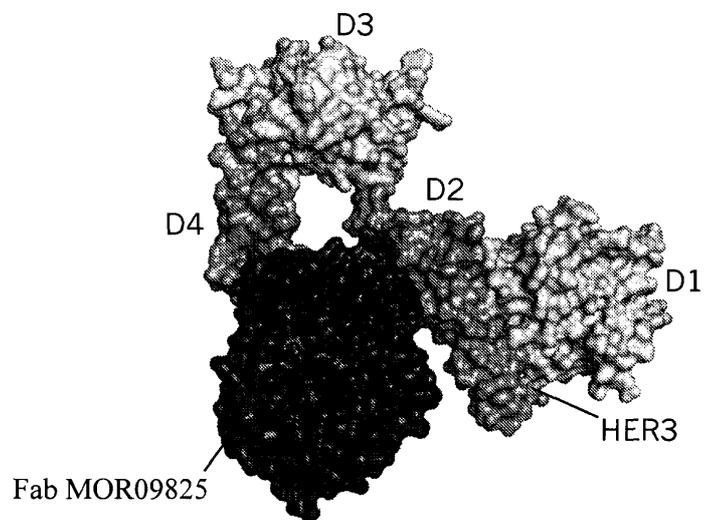
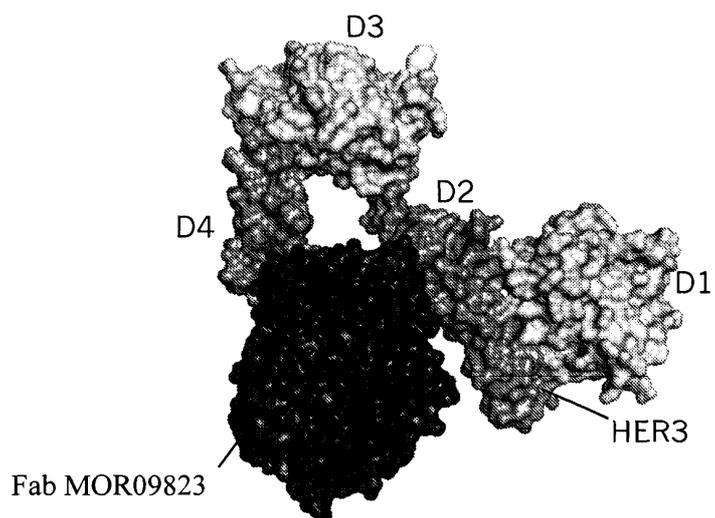
Домен связывания HER3
(по данным ELISA)



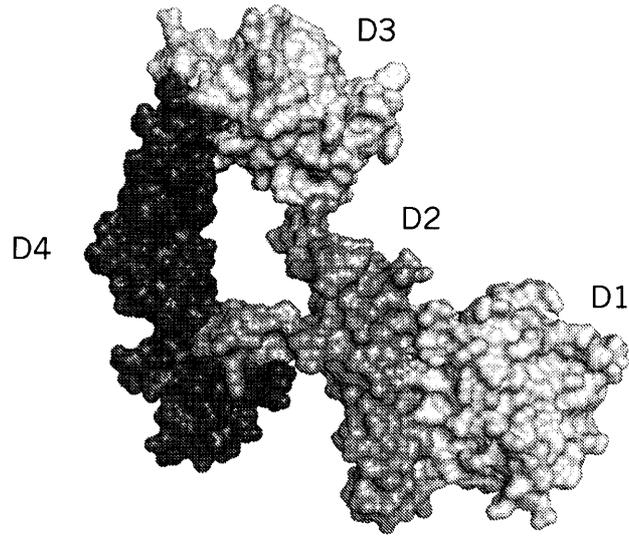
Фиг. 3



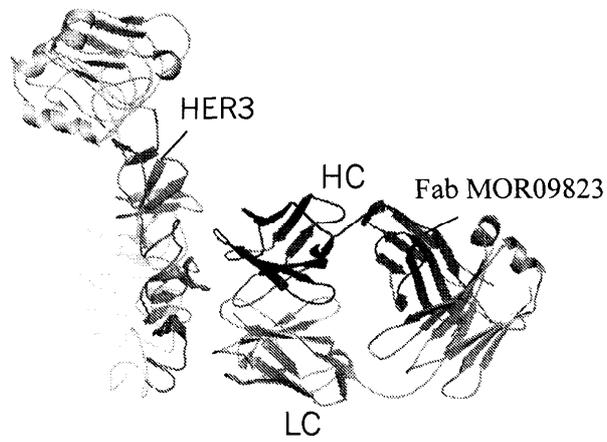
Фиг. 4B



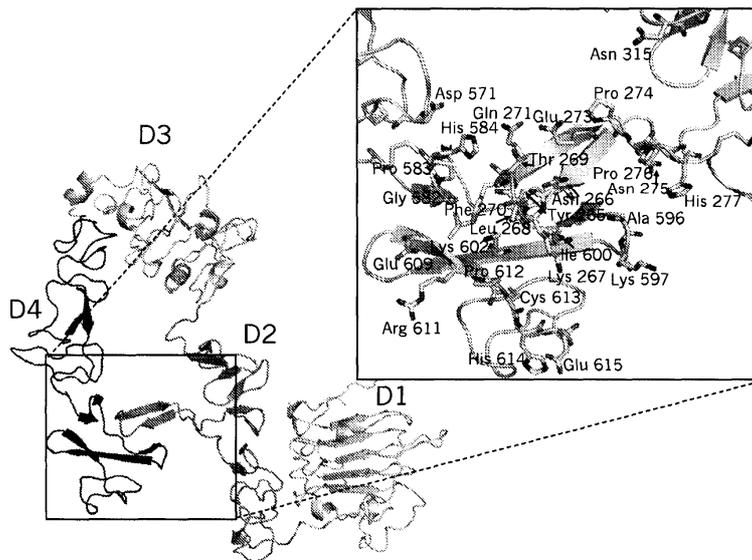
Фиг. 5A



Фиг. 5Б

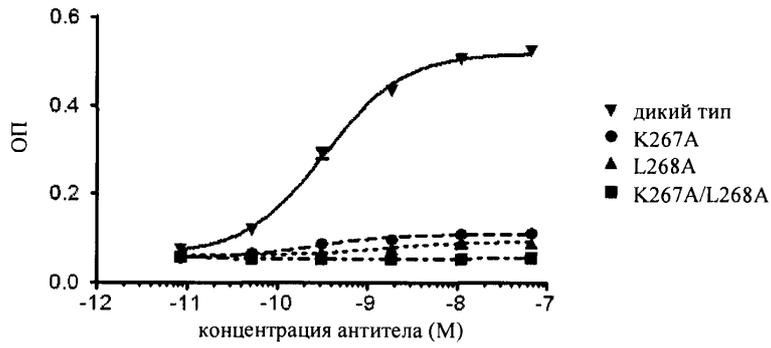


Фиг. 5В



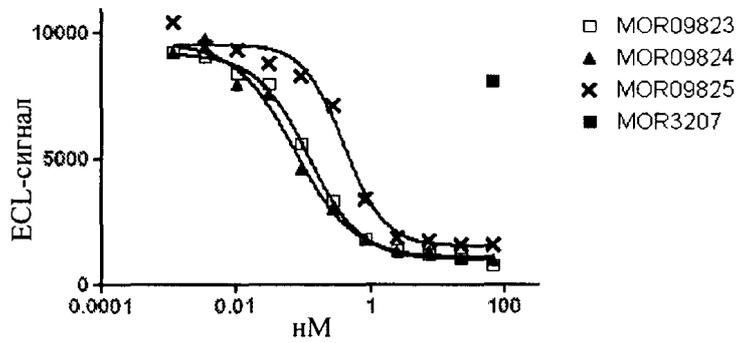
Фиг. 5Г

Связывание MOR10703 с HER3



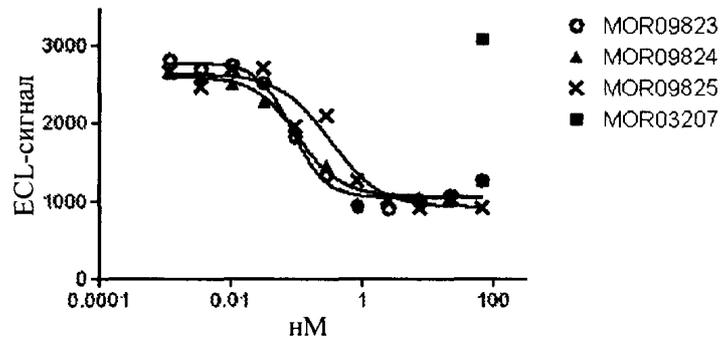
Фиг. 5Д

Ингибирование фосфорилирования HER3 в стимулированных клетках линии MCF7



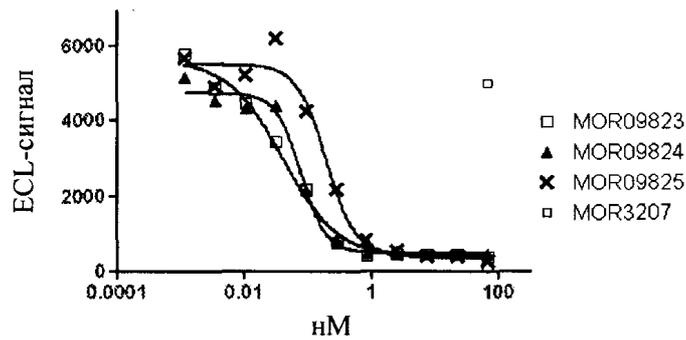
Фиг. 6А

Ингибирование фосфорилирования HER3 в стимулированных клетках линии SKBR3

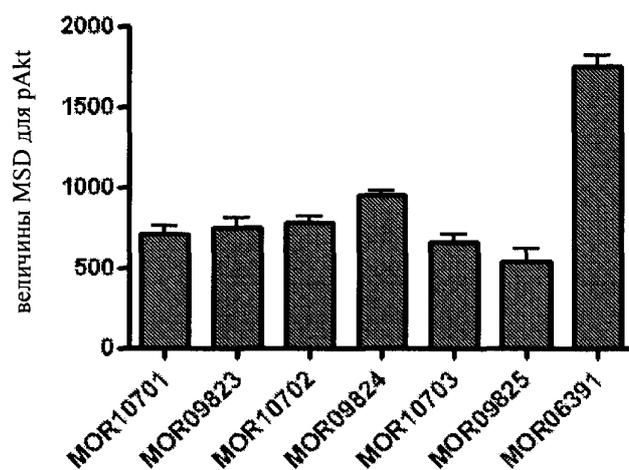


Фиг. 6Б

Ингибирование фосфорилирования Akt в клетках линии SKBR3

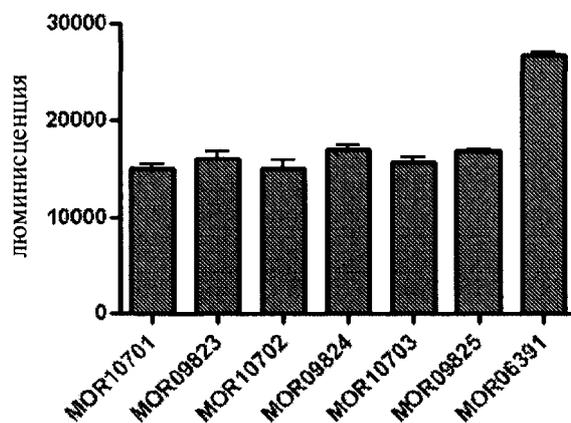


Фиг. 7А

pAkt(S⁴⁷³) в клетках линии BT-474

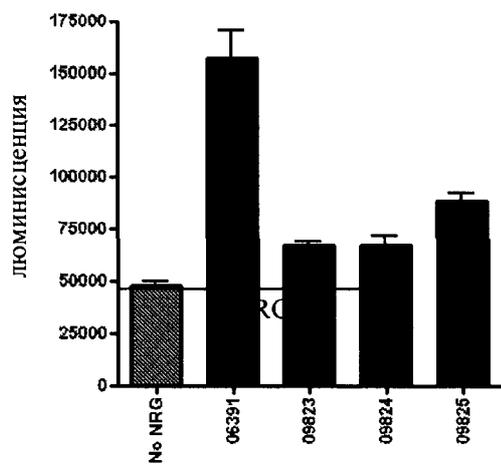
Фиг. 7Б

Пролиферация клеток линии BT-474



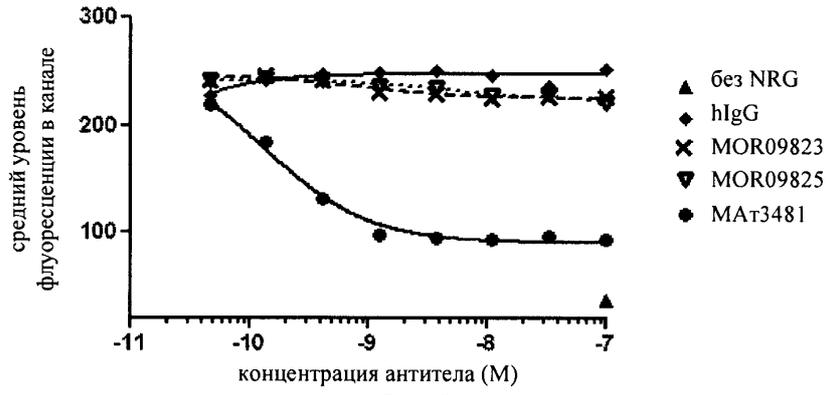
Фиг. 8А

Индукцированная NRG пролиферация клеток линии MCF7



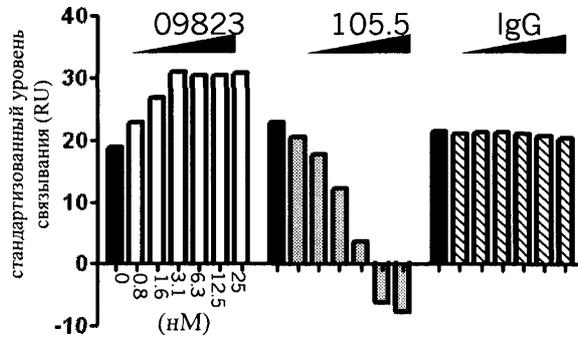
Фиг. 8Б

Блокирование связывания MCF7 с лигандом



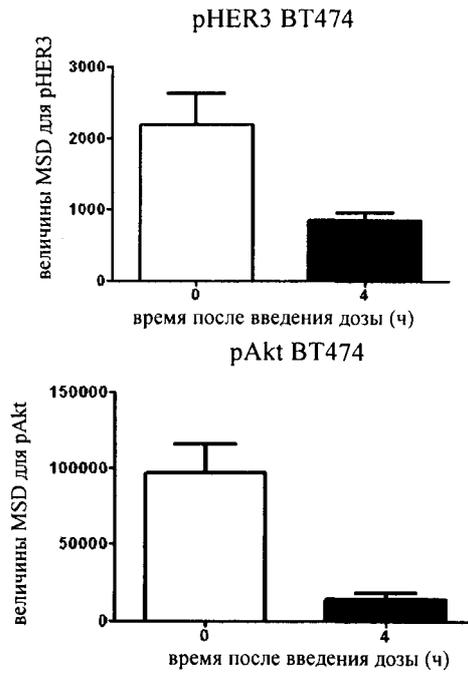
Фиг. 9

Анализ влияния на связывание NRG/HER3



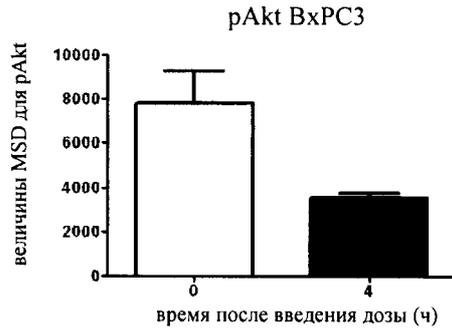
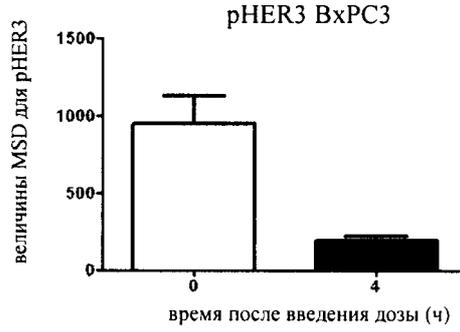
Фиг. 10

Обработанные MOR0923 ксенотрансплантаты BT474

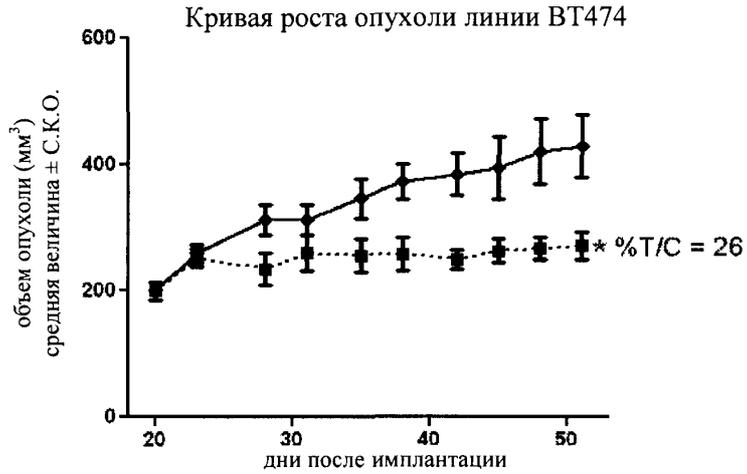


Фиг. 11А

Обработанные MOR0923
ксенотрансплантаты ВхРСЗ



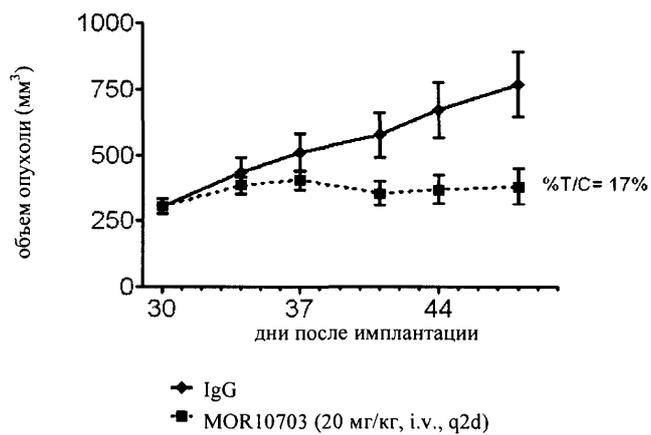
Фиг. 11Б



- ◆ IgG1 (21 мг/кг, i.v., q2d)
- MOR10701 (20 мг/кг, i.v., q2d)

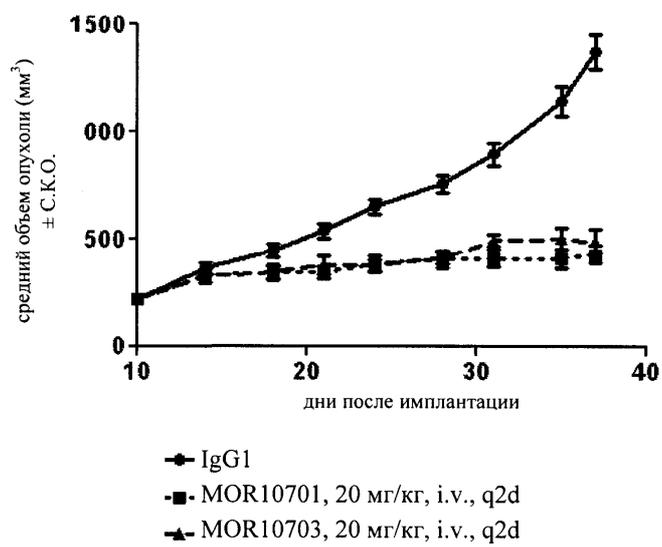
Фиг. 12А

Кривая роста опухоли линии ВТ474

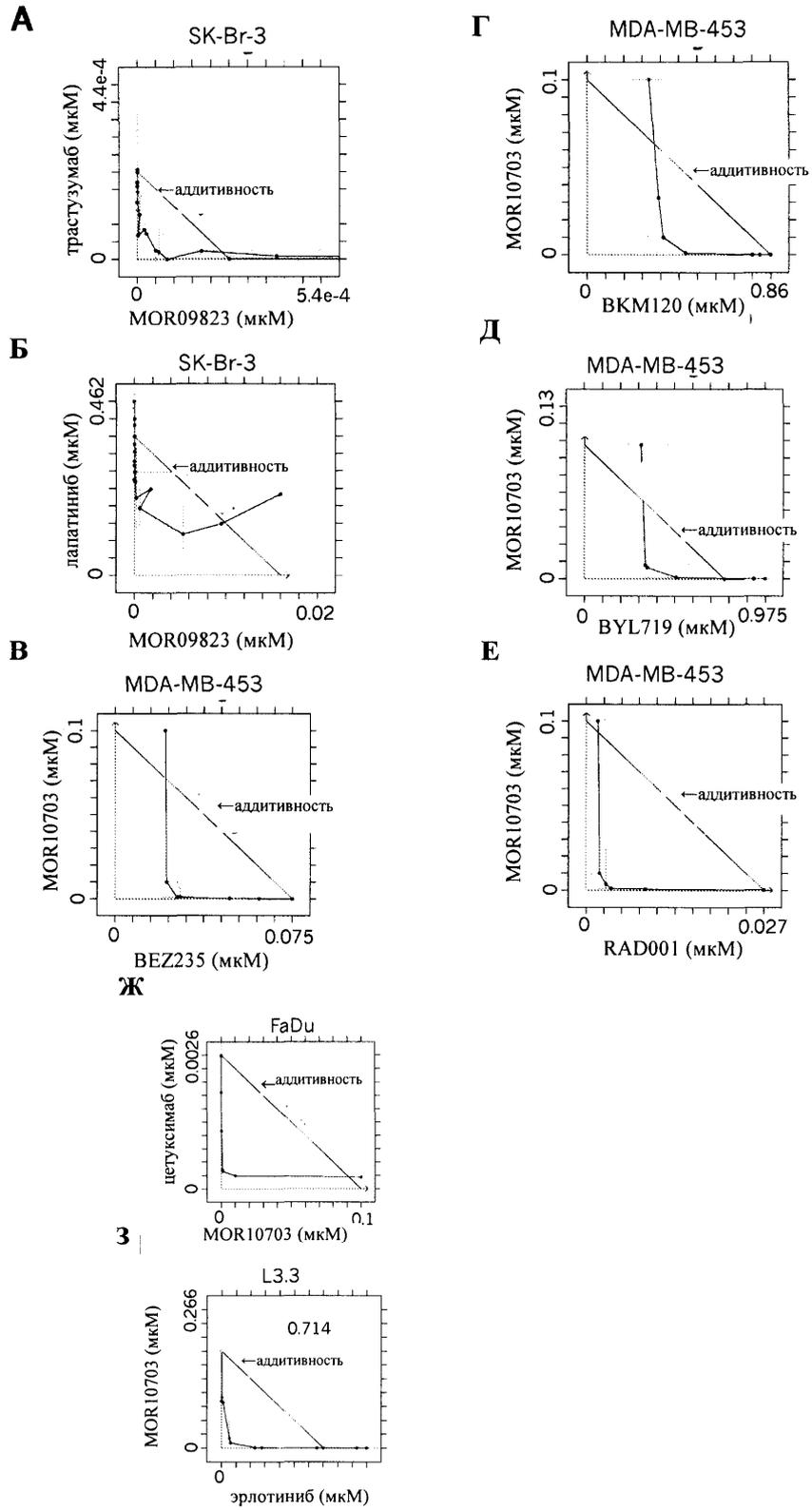


Фиг. 12Б

Кривая роста опухоли линии ВхРС3

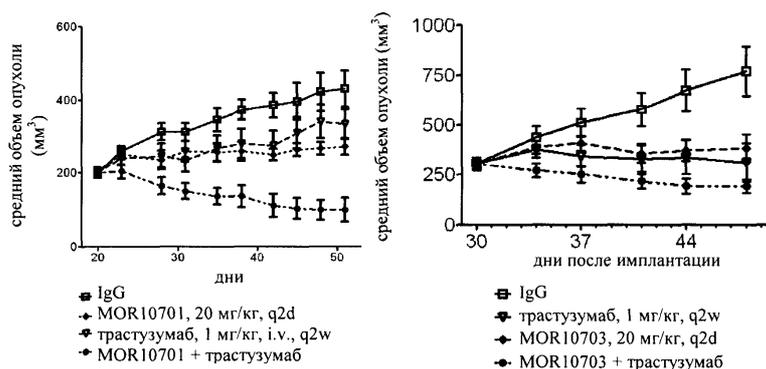


Фиг. 13



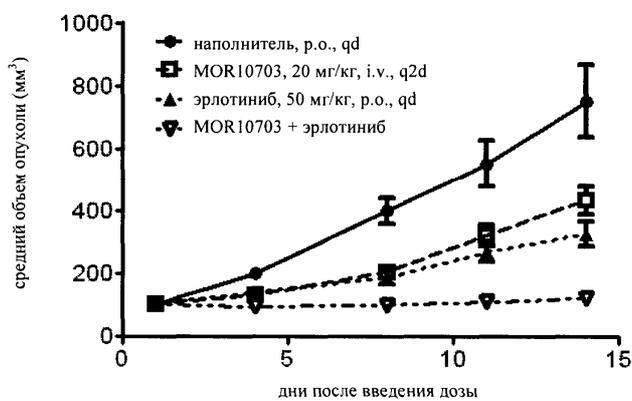
Фиг. 14

Кривая роста опухоли линии BT474



Фиг. 15А

Кривая роста опухоли линии L3.3



Фиг. 15Б

