

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036739**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.15**(21) Номер заявки  
**201491103**(22) Дата подачи заявки  
**2012.12.04**(51) Int. Cl. **C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 31/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)**(54) АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА 3 (HER3)**(31) **61/566,890**(32) **2011.12.05**(33) **US**(43) **2015.03.31**(86) **PCT/IB2012/056949**(87) **WO 2013/084147 2013.06.13**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НОВАРТИС АГ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Элис Винфрид (DE), Эттенберг Сет,  
Гарнер Эндрю Пол (US), Хаубст  
Николь (DE), Хуан Сичжун (US), Кунц  
Кристиан Карстен Сильвестер (DE),  
Рейсингер Спрейг Элизабет Энн, Шэн  
Цин (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**(56) **WO-A1-2012022814****WO-A1-2010127181****WO-A2-2011136911****WO-A1-2011076683****WO-A1-2011144749****WO-A1-2009137429****WOLFF ANTONIO C. ET AL.: "AMERICAN  
SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY/COLLEGE**

**OF AMERICAN PATHOLOGISTS GUIDELINE  
RECOMMENDATIONS FOR HUMAN  
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2  
TESTING IN BREAST CANCER", ARCHIVES  
OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE,  
COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, US,  
vol. 131, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages  
18-43, XP008077476, ISSN: 0003-9985, the whole  
document**

**WO-A2-2011112953**

**CHIBA TSUTOMU: "What are the real roles  
of different erbB proteins in Barrett's Esophagus",  
DIGESTION 2004, vol. 70, no. 2, 16 September 2004  
(2004-09-16), pages 93-94, XP002698843, ISSN:  
0012-2823, the whole document**

**NISHIGAKI HITOSHI ET AL.: "ErbB2  
without ErbB3 expression in metaplastic columnar  
epithelium of Barrett's esophagus", DIGESTION  
2004, vol. 70, no. 2, 16 September 2004 (2004-09-16),  
pages 95-102, XP008163004, ISSN: 0012-2823, page  
99 - page**

**JUNTTILA TEEMU T. ET AL.: " Ligand-  
independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted  
by trastuzumab and is effectively inhibited by  
the PI3K inhibitor GDC-0941", CANCER CELL,  
CELL PRESS, US, vol. 15, no. 5, 5 May  
2009 (2009-05-05), pages 429-440, XP002592637,  
ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCR.2009.03.020  
[retrieved on 2009-05-04], the whole document**

(57) Изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые взаимодействуют с семейством рецепторов HER, например рецептором HER3. В частности, изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые распознают конформационный эпитоп рецептора HER3, содержащий остатки как из домена 2, так и из домена 4, что приводит к ингибированию как лиганд-зависимой, так и лиганд-независимой передачи сигнала; и обеспечивают связывание лиганда (например, нейрорегулина), одновременно препятствуя лиганд-индуцируемой активации передачи сигнала. Эти антитела или фрагменты можно использовать для лечения ряда заболеваний или нарушений, характеризующихся увеличенными уровнями экспрессии HER3 (например, рак пищевода). Эти антитела или фрагменты можно использовать для лечения ряда заболеваний или нарушений, характеризующихся способностью антител или фрагментов уменьшать массу ткани (например, массу предстательной железы или матки) или индуцировать атрофию ткани (например, атрофию мужской молочной железы). Альтернативно, эти антитела или фрагменты могут быть использованы для лечения нарушений, характеризующихся увеличенными уровнями экспрессии HER3 в пищеводе, рака желудка или рака головы и шеи.

**B1****036739****036739****B1**

### Родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/566890, поданной 5 декабря 2011 г., содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится, главным образом, к антителам или их фрагментам, которые взаимодействуют с семейством рецепторов HER, например рецептором HER3. В частности, оно относится к антителам или их фрагментам, которые распознают конформационный эпитоп рецептора HER3, содержащий остатки из обоих доменов 2 и 4, что приводит к ингибированию как лиганд-зависимой, так и лиганд-независимой передачи сигнала; и позволяет связывание лиганда (например, нейрорегулина), предотвращая лиганд-индуцированную активацию передачи сигнала. Эти антитела или фрагменты можно использовать для лечения ряда заболеваний или нарушений, характеризующихся увеличенными уровнями экспрессии HER3 (например, рак пищевода). Эти антитела или фрагменты можно использовать для лечения ряда заболеваний или нарушений, характеризующихся способностью антител или фрагментов уменьшать массу ткани (например, массу предстательной железы или матки) или индуцировать атрофию ткани (например, атрофию молочной железы у мужчины).

### Уровень техники, к которому относится изобретение

Рецептор эпидермального фактора роста 3 (ErbB3, также известный как HER3) человека представляет собой рецепторную протеинтирозинкиназу и принадлежит подсемейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) рецепторных протеинтирозинкиназ, которое также включает EGFR (HER1, ErbB1), HER2 (ErbB2, Neu) и HER4 (ErbB4) (Plowman et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4905-4909; Kraus et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:9193-9197; и Kraus et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2900-2904). Подобно прототипному рецептору эпидермального фактора роста, трансмембранный рецептор HER3 состоит из внеклеточного лигандсвязывающего домена (ECD), домена димеризации в ECD, трансмембранного домена, внутриклеточного протеинтирозинкиназа-подобного домена (TKD) и С-концевого домена фосфорилирования. В отличие от других представителей семейства HER, киназный домен HER3 проявляет очень низкую собственную киназную активность.

Лиганды нейрорегулин 1 (NRG) или нейрорегулин 2 связываются с внеклеточным доменом HER3 и активируют опосредуемый рецептором каскад передачи сигнала посредством стимуляции димеризации с другими партнерами по димеризации, такими как HER2. Гетеродимеризация приводит к активации и трансфосфорилированию внутриклеточного домена HER3 и является средством не только для диверсификации сигнала, но также и для усиления сигнала. Кроме того, гетеродимеризация HER3 также может происходить в отсутствие активирующих лигандов, и ее обычно называют лиганд-независимой активацией HER3. Например, когда HER2 экспрессируется на высоких уровнях в результате амплификации гена (например, при раке молочной железы, легкого яичника или желудка), могут образовываться спонтанные димеры HER2/HER3. В этой ситуации HER2/HER3 считается наиболее активным передающим сигнал ErbB димером и, таким образом, является в высокой степени трансформирующим.

Увеличенный уровень HER3 был обнаружен в нескольких типах рака молочной железы, легкого, желудочно-кишечного рака и рака поджелудочной железы. Интересно, что была показана корреляция между экспрессией HER2/HER3 и прогрессированием из неинвазивной в инвазивную стадию (Alimandi et al., (1995), *Oncogene*, 10:1813-1821; DeFazio et al., (2000), *Cancer*, 87:487-498; Naidu et al., (1988), *Br. J. Cancer*, 78:1385-1390). Таким образом, требуются средства, которые препятствуют опосредуемой HER3 передаче сигнала.

### Сущность изобретения

Изобретение основано на открытии антигенсвязывающих белков (например, антител или их фрагментов), которые связываются с конформационным эпитопом рецептора HER3, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 HER3. Это связывание антител или их фрагментов с доменом 2 и доменом 4 стабилизирует рецептор HER3 в неактивной или закрытой конформации, так что активация HER3 ингибируется. Неожиданно, связывание антител или их фрагментов с этим конформационным эпитопом блокирует каскады как лиганд-зависимой (например, нейрорегулин), так и лиганд-независимой передачи сигнала HER3. Более того, опосредуемое антителом ингибирование индуцируемой лигандом передачи сигнала происходит без блокирования связывания лиганда (т.е. как лиганд, так и антитело могут связывать HER3), предположительно, поскольку HER3 не может претерпевать конформационную перестройку, требуемую для активации. Также описаны способы применения антител или их фрагментов для лечения ряда заболеваний или нарушений, характеризующихся увеличенной экспрессией HER3; и заболеваний или нарушений, характеризующихся способностью антител или фрагментов уменьшать массу ткани (например, массу предстательной железы или матки) или индуцировать атрофию ткани (например, атрофию молочной железы у мужчины).

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу лечения нарушения, характеризующегося увеличенными уровнями экспрессии HER3 в пищеводе, включающему выбор пациента, страдающего увеличенными уровнями экспрессии HER3 в пищеводе; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фраг-

мент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение нарушения. В одном варианте осуществления нарушение выделено из группы, состоящей из рака пищевода и рака пищевода Барретта.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения рака желудка, включающему выбор пациента, страдающего раком желудка; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение рака желудка.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения рака головы и шеи, включающему выбор пациента, страдающего раком головы и шеи; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение рака головы и шеи.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения доброкачественной гипоплазии предстательной железы, включающему выбор пациента, страдающего доброкачественной гипоплазией предстательной железы; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение доброкачественной гипоплазии предстательной железы.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения гинекомастии, включающему выбор пациента, страдающего гинекомастией; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение гинекомастии.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения эндометриоза, включающему выбор пациента, страдающего эндометриозом; и введение антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, тем самым осуществляя лечение эндометриоза.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент вводят путем, выбранным из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, интрацеребровентрикулярного, интрапаренхиматозного, интратекального, внутричерепного, буккального, мукозального, назального и ректального введения. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент составляют в виде фармацевтической композиции, содержащей физиологически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит дополнительное терапевтическое средство. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора HER1, ингибитора HER2, ингибитора HER3, ингибитора HER4, ингибитора mTOR и ингибитора PI3-киназы. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор HER1, выбранный из группы, состоящей из матузумаба (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаба, Vectibix®/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 (U3 Pharma AG), AMG888 (Amgen), AV-203 (Aveo), MEHD7945A (Genentech), MOR10703 (Novartis) и низкомолекулярных соединений, которые ингибируют HER3; и ингибитор HER4. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из группы, состоящей из темсиролимуса/Torisel®, ридафоролимуса/дефоролимуса, AP23573, MK8669, эверолимуса/Affinitor®. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор PI3-киназы, выбранный из группы, состоящей из GDC 0941, BEZ235, BMK120 и BYL719.

В другом аспекте изобретение относится к применению антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанное антитело или его фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, для получе-

ния терапевтического средства для лечения нарушения пищевода, или рака желудка, или рака головы и шеи, или доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ВРН), или гинекомастии, или эндометриоза.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Репрезентативные кривые SET для MOR10701, полученные с помощью HER3 человека, мыши, крысы и яванского макака.

Фиг. 2: Определение связывания клеток SK-Bv-3 посредством титрования FACS.

Фиг. 3: ELISA связывания домена HER3.

Фиг. 4: Картирование эпитопа посредством водородно/дейтериевого обмена. А) Пептиды ECD HER3, выделенные после анализа HDX-MS, указаны пунктирными линиями. Потенциальные участки N-связанного гликозилирования выделены. В) Относительная степень дейтерирования, наблюдаемая в пептидах, идентифицированных с помощью MS. С) Защищенные остатки, картированные на опубликованной кристаллической структуре HER3.

Фиг. 5: А) Представление поверхности рентгеновских кристаллических структур HER3/MOR09823 и HER3/MOR09825. HER3 (светло-серый цвет) представляет собой закрытую конформацию, и MOR09823 или MOR09825 (темно-серый цвет) связываются как с доменом 2, так и с доменом 4. В) Вид поверхности HER3 из структуры HER3/MOR09823, представленной в ориентации, сходной с (А). MOR09823 исключен для ясности. С) Структура HER3/MOR09823, проиллюстрированная в качестве ленточной структуры, представленная при вращении 90° относительно панелей (А), (В) и (D). D) Ленточное изображение неактивной конформации HER3, распознаваемой Fab MOR09823, с крупным планом поверхности контакта домен 2/домен 4, с выделением остатков HER3, которые находятся в пределах 5 Å от Fab. E) Определение связывания мутантного HER3/MOR10703 посредством титрования способом ELISA.

Фиг. 6: Ингибирование индуцируемого лигандом (А) или лиганд-независимого (В) фосфорилирования HER3.

Фиг. 7: Ингибирование зависимых от HER3 последующих каскадов передачи сигнала в клеточных линиях с амплифицированным HER2.

Фиг. 8: Влияние ингибирования HER3 на рост клеток в А) BT-474 и В) стимулированных нейрорегулинов клетках MCF7.

Фиг. 9: Эффект MOR09823 и MOR09825 на связывание нейрорегулина с клетками MCF7.

Фиг. 10: Влияние связывания MOR09823 на образование комплекса HER3/нейрорегулин при оценке способом Viacore™. Без антитела (черные столбики), MOR09823 (белые столбики), 105.5 (серые столбики) и контрольный IgG (столбики в полоску).

Фиг. 11: Опосредуемое MOR09823 ингибирование (А) лиганд-независимой (BT-474) и (В) лиганд-зависимой (ВхРС3) передачи сигнала HER3 *in vivo*.

Фиг. 12: Влияние MOR10701 и MOR10703 на рост опухоли BT-474.

Фиг. 13: Влияние MOR10701 и MOR10703 на рост опухоли ВхРС3.

Фиг. 14: Изоболограмма комбинаций лекарственных средств с MOR10703 *in vitro* (А) MOR09823/трастузумаб, (В) MOR09823/лапатиниб, (С) MOR10703/BEZ235, (D) MOR10703/ВКМ120, (E) MOR10703/ВУЛ719, (F) MOR10703/RAD001, (G) MOR10703/цетуксимаб и (H) MOR10703/эрлотиниб.

Фиг. 15: Комбинации MOR10701 или MOR10703 *in vivo* с (А) трастузумабом и (В) эрлотинибом в BT-474 и L3.3.

Фиг. 16: MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vitro* с (А) цетуксимабом и (В) ВУЛ719 на клетках пищевода.

Фиг. 17: MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vivo* с (А) цетуксимабом и (В) ВУЛ719 в моделях опухоли пищевода KYSE140 и KYSE180.

Фиг. 18: MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vivo* с (А) цетуксимабом и (В) ВУЛ719 в моделях опухоли пищевода CHE007 и (С) MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vivo* с цетуксимабом в модели опухоли пищевода CHES015.

Фиг. 19: MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vivo* с ВУЛ719 в модели опухоли желудка N87, демонстрирующие длительную регрессию опухоли.

Фиг. 20: MOR10703 отдельно или комбинации MOR10703 *in vivo* с цетуксимабом в модели A253 SCCHN, лечение либо MOR10703, либо цетуксимабом, в качестве единственного средства приводило к остановке роста опухоли. Комбинация MOR10703 с цетуксимабом приводила к регрессии опухоли.

#### Подробное описание изобретения

##### Определения

Для того чтобы настоящее изобретение могло быть более понятным, сначала определены некоторые термины. Дополнительные определения представлены на протяжении подробного описания.

Выражение "передача сигнала" или "активность передачи сигнала", как используют в рамках изобретения, относится к биохимической причинно-следственной связи, обычно инициируемой белок-белковым взаимодействием, таким как связывание фактора роста с рецептором, приводящим к передаче сигнала из одной части клетки в другую часть клетки. Для HER3 передача вовлекает специфическое

фосфорилирование одного или нескольких остатков тирозина, серина или треонина на одном или нескольких белках в серии реакций, вызывающих передачу сигнала. Предконечные процессы, как правило, включают ядерные события, приводящие к изменению экспрессии генов.

"Рецептор HER" представляет собой рецепторную протеинтирозинкиназу, которая принадлежит семейству рецепторов HER и включает рецепторы EGFR, HER2, HER3 и HER4 и других представителей этого семейства, которые будут идентифицированы в будущем. Рецептор HER содержит, главным образом, внеклеточный домен, который может связывать лиганд HER; липофильный трансмембранный домен; консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен и С-концевой домен передачи сигнала, содержащий несколько остатков тирозина, которые могут быть фосфорилированными. Предпочтительно рецептор HER представляет собой рецептор HER человека с нативной последовательностью.

Термины "HER1", "ErbB1", "рецептор эпидермального фактора роста" и "EGFR" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к EGFR, как описано, например, в Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), включая его встречающиеся в природе мутантные формы (например, мутант EGFR с делецией, как в Humphrey et al., (1990), *PNAS (USA)* 87:4207-4211). ErbB1 относится к гену, кодирующему белковый продукт EGFR.

Термины "HER2" и "ErbB2" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к белку HER2 человека, описанному, например, в Semba et al., (1985), *PNAS (USA)* 82:6497-6501 и Yamamoto et al. (1986), *Nature*, 319:230-234 (номер доступа в Genebank X03363). Термин "erbB2" относится к гену, кодирующему ErbB2 человека, и "neu" относится к гену, кодирующему p185<sup>neu</sup> крысы.

Термины "HER4" и "ErbB4" в настоящем описании относятся к рецепторному полипептиду, как описано, например, в патентной заявке EP № 599274; Plowman et al., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750; и Plowman et al., (1993) *Nature*, 366:473-475, включая его изоформы, например, как описано в WO 99/19488, опубликованной 22 апреля 1999 г.

Термин "HER3" или "рецептор HER3", также известный как "ErbB3", как используют в рамках изобретения, относится белку HER3 млекопитающих, и "her3" или "ErbB3" относятся к гену her3 млекопитающих. Предпочтительным белком HER3 является белок HER3 человека, присутствующий в клеточной мембране клетки. Ген her3 человека описан в патенте США № 5480968 и Plowman et al., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4905-4909.

HER3 человека определен в записи с номером доступа № NP 001973 (человек) и представлен ниже в качестве 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 klyercevvm  
 gnleivltgh nadlsflqwi revtgyvlva mnefstlplp nlrvvrgtqv ydgkfaifvm  
 lnyntnssha lrqlrtqlt eilsggyvie kndklchmdt idwrdivrdr daeivvkdng  
 rscppchevc kgrcwpggse dcqtlktic apqcnghcfc pnpnqcchde caggcsgpqq  
 tdcfacrhfn dsgacvprcp qplvynklft qlepnphkty qyggvcvase phnfvvdqts  
 cvracppdkm evdknglkmc epcggclpka cegtgsgrf qtdvssnidg fvnctkilgn  
 ldflitgng dpwhkipald peklnvfrtv reitgylniq swpphmhns vfnlittigg  
 rslynrgfsl limklnvts lgfrslkeis agriyisanr qlcyhhslnw tkvlrgptee  
 rldikhnrpr rdvcaegkvc dplcssggcw gpgpgqclsc mnsrggvcv thenflngep  
 refaheaecf schpecqpmc gtatcngsgs dtcaqcahfr dgphvcvsscp hgvlgakgpi  
 ykypdvqnc rpchenctqg ckgpelqdcl gqtlvligkt hltmaltvia glvvifmmlg  
 gtflywrgrr iqnkramrry lergesiepl dpsekankvl arifketelr klkvlsgsvf  
 gtvhkgvwip egesikipvc ikviedksgr qsfqavtdhm laigsldhah ivrllglcpg  
 sslqlvtqyl plgsldhvr qhrgalgpql llwngvqiak gmyyleehgm vhrnlaarnv  
 llkspsqvqv adfgvadllp pddkqlyse aktvikwmal esihfgkyth qsdvwsygvw  
 vwelmtfgae pyagrlaev pdllekerl aqpqictidv ymvvmkvwmi denirptfke  
 laneftrmar dpprylvikr esgpgiapgp ephgltknkl eevelepeld ldldleaed  
 nlatltlgsa lslpvgtlr prgsqllsp ssgympmnqg nlgescquesa vsgercpr  
 pvsllhpmprg clasessegh vtgseaelqe kvsmcrsr srsprrgds ayhsqrhsl  
 tptvplsppg leeedvngyv mpdthlkgtp ssregtlssv glssvlgtee ededeeyeym  
 nrrrrhspp pprpsleel gyeymdvgsd lsaslgstqs cplhvpimp tagttdedy  
 eymnrqrdgg gpggdyaamg acpaseqgye emrafqgpg qaphvhyarl ktlrleatd  
 safdnpywh srlfpkanaq rt (SEQ ID NO: 1)

Термин "лиганд HER", как используют в рамках изобретения, относится к полипептидам, которые связывают и активируют рецепторы HER, такие как HER1, HER2, HER3 и HER4. Примеры лигандов HER включают, но не ограничиваются ими, нейрорегулин 1 (NRG), нейрорегулин 2, нейрорегулин 3, нейрорегулин 4, бетацеллюлин, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста, эпирегулин, эпидермальный фактор роста, амфирегулин и трансформирующий фактор роста альфа. Термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты встречающегося в природе полипептида.

Термин "лиганд HER3", как используют в рамках изобретения, относится к полипептидам, которые связывают и активируют HER3. Примеры лигандов HER3 включают, но не ограничиваются ими, нейрорегулин 1 (NRG) и нейрорегулин 2, бетацеллюлин, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста и эпирегулин. Термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты встречающегося в природе полипептида.

"Белковый комплекс HER-HER" представляет собой нековалентно связанный 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 клетка, экспрессирующая оба из этих рецепторов, подвергается воздействию лиганда HER, например NRG, или когда рецептор HER является активным или сверхэкспрессирован.

"Белковый комплекс HER2-HER3" представляет собой нековалентно связанный олигомер, содержащий рецептор HER2 и рецептор HER3. Этот комплекс может образовываться, когда клетка, экспрессирующая оба из этих рецепторов, подвергается воздействию лиганда HER3, например, NRG, или когда HER2 является активным/сверхэкспрессирован.

Выражение "активность HER3" или "активация HER3", как используют в рамках изобретения, относится к повышению олигомеризации (например, увеличению уровня комплексов, содержащих HER3), фосфорилированию HER3, конформационным перестройкам (например, перестройкам, индуцируемыми лигандами) и опосредуемой HER3 последующей передаче сигнала.

Термин "стабилизация" или "стабилизированный", используемый в контексте HER3, относится к антителу или его фрагменту, которые прямо поддерживают (запирают, ограничивают, удерживают, предпочтительно связывают, способствуют) неактивное состояние или конформацию HER3 без блокирования связывания лиганда с HER3, так что связывание лиганда более неспособно активировать HER3. Для измерения связывания лиганда со стабилизированным рецептором HER3 можно использовать ана-

лизы, описанные в разделе "Примеры", например анализ Biacore.

Термин "лиганд-зависимая передача сигнала", как используют в рамках изобретения, относится к активации HER (например, HER3) через лиганд. Об активации HER3 свидетельствует увеличенная олигомеризация (например, гетеродимеризация) и/или фосфорилирование HER3, так что происходит активация последующих каскадов передачи сигнала (например, PI3K). Антитело или его фрагмент могут на статистически значимом уровне уменьшать количество фосфорилированного HER3 в стимулированной клетке, подвергнутой воздействию антигенсвязывающего белка (например, антитела), относительно необработанной (контрольной) клетки, при измерении с использованием анализов, описанных в разделе "Примеры". Клетка, которая экспрессирует HER3, может представлять собой встречающуюся в природе клеточную линию (например, MCF7) или может быть рекомбинантно полученной путем внесения нуклеиновых кислот, кодирующих белок HER3, в клетку-хозяина. Стимуляция клеток может происходить либо через экзогенное присоединение активирующего лиганда HER3, либо посредством эндогенной экспрессии активирующего лиганда.

Антитело или его фрагмент, которые "снижают индуцируемую нейрорегулином активацию HER3 в клетке", представляют собой антитело или его фрагмент, которые на статистически значимом уровне снижают фосфорилирование тирозина HER3 относительно необработанной (контрольной) клетки, при измерении с использованием анализов, описанных в разделе "Примеры". Это можно определять на основе уровней фосфотирозина HER3 после воздействия на HER3 NRG и представляющего интерес антитела. Клетка, которая экспрессирует белок HER3, может представлять собой встречающуюся в природе клетку или клеточную линию (например, MCF7) или может быть полученной рекомбинантными способами.

Термин "лиганд-независимая передача сигнала", как используют в рамках изобретения, относится к клеточной активности HER3 (например, фосфорилированию) в отсутствие потребности в связывании лиганда. Например, лиганд-независимая активация HER3 может быть результатом сверхэкспрессии HER2 или активирующих мутаций в партнерах гетеродимера HER3, таких как EGFR и HER2. Антитело или его фрагмент могут на статистически значимом уровне снижать количество фосфорилированного HER3 в клетке, подвергнутой воздействию антигенсвязывающего белка (например, антитела), относительно необработанной (контрольной) клетки. Клетка, которая экспрессирует HER3, может представлять собой встречающуюся в природе клеточную линию (например, SK-Br-3) или может быть получена рекомбинантными способами путем введения нуклеиновых кислот, кодирующих белок HER3, в клетку-хозяина.

Термин "блокирует", как используют в рамках изобретения, относится к остановке или предотвращению взаимодействия или процесса, например, остановке лиганд-зависимой или лиганд-независимой передачи сигнала.

Термин "распознает", как используют в рамках изобретения, относится к антителу или его фрагменту, которые находят и взаимодействуют (например, связываются) с его конформационным эпитопом.

Выражение "одновременно связывает", как используют в рамках изобретения, относится к лиганду HER3, который может связываться с лигандсвязывающим участком на рецепторе HER3 вместе с антителом против HER3 или его фрагментом. Это означает, что как антитело, так и лиганд могут связываться с рецептором HER3 вместе. Только для иллюстрации, лиганд HER3, NRG, может связываться с рецептором HER3 вместе с антителом против HER3. Анализы для определения одновременного связывания лиганда и антитела описаны в разделе "Примеры".

Термин "не может", как используют в рамках изобретения, относится к антителу или его фрагменту, которые не осуществляют конкретное действие. Например, антитело или его фрагмент, которые "не могут активировать передачу сигнала", представляют собой антитело или его фрагмент, которые не запускают передачу сигнала; антитело или его фрагмент, которые "не могут индуцировать конформационное изменение", представляют собой антитело или его фрагмент, которые не вызывают структурного изменения рецептора HER; антитело или его фрагмент, которые стабилизируют рецептор HER в неактивном состоянии, так чтобы рецептор HER "не мог димеризоваться", представляют собой антитело или его фрагмент, которые не образуют белок-белковые комплексы.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, относится к целым антителам, которые взаимодействуют с (например, путем связывания, пространственного препятствования, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) эпитопом HER3 и ингибируют передачу сигнала. Встречающееся в природе "антитело" представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно в настоящем документе VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL, кроме того, могут быть подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), встроенные в области, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержит три CDR и четыре FR, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включающими различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Термин "антитело" включает, например, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, камелизованные антитела, химерные антитела, одноцепочечные Fv (scFv), связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам по изобретению), и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Антитела могут быть любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Как легкие, так и тяжелые цепи подразделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используют функционально. В этом отношении понятно, что вариабельные домены частей легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей, определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Согласно правилу нумерации доменов константной области возрастает по мере того, как они становятся более отдаленными от участка связывания антигена или N-конца антитела. N-конец представляет собой вариабельную область, и на C-конце расположена константная область; домены CH3 и CL в действительности содержат C-конец тяжелой и легкой цепей соответственно.

Выражение "фрагмент антитела", как используют в рамках изобретения, относится к одной или нескольким частям антитела, которые сохраняют способность специфично взаимодействовать (например, путем связывания, пространственного препятствования, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом HER3 и ингибировать передачу сигнала. Примеры связывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; F(ab)<sub>2</sub>-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, 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 et al., (1989), *Nature*, 341:544-546), который состоит из VH-домена; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

Более того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединять с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который обеспечивает получение их в качестве единой белковой цепи, в которой VL- и VH-области образуют пары, формируя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al., (1988), *Science*, 242:423-426; и Huston et al., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Подразумевают, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "фрагмент антитела". Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу в отношении применимости аналогично тому, как и целые антитела.

Фрагменты антител также могут быть включены в "однодоменные антитела", "максиантитела", "мини-антитела", "интраантитела", "диантитела", "триантитела", "тетраантитела", "v-NAR" и "bis-scFv" (см., например, Hollinger and Hudson, (2005), *Nature Biotechnology*, 23:1126-1136). Фрагменты антител можно пересаживать в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны моноантитела на основе фибронектинового полипептида).

Фрагменты антител могут быть включены в одноцепочечные молекулы, содержащие пару тандемных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., (1995), *Protein Eng.* 8:1057-1062; и патент США № 5641870).

Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или иным образом взаимодействующему с молекулой. Эпитопные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углеводов или Сахаров, и могут обладать конкретными трехмерными характеристиками, а также конкретными зарядовыми характеристиками. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным".

Термин "линейный эпитоп" относится к эпитопу, в котором все из точек взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) встречаются линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывный). После определения желательного эпитопа на антигене можно получить антитела к этому эпитопу, например, с использованием способов, описанных в рамках настоящего изобретения. Альтернативно, в процессе разработки получение и охарактеризация антител могут прояснить информацию о желательных эпитопах. Затем, исходя из этой информации, можно проводить конкурентный скрининг антител в отношении связывания с тем же эпитопом. Подходом для достижения этого является проведение исследований перекрестной конкуренции для поиска антител, которые конкурентно связываются друг с другом, например антител, которые конкурируют за свя-



зывание с антигеном. Высокопроизводительный способ "сортировки" антител на основе их перекрестной конкуренции описан в международной патентной заявке № WO 2003/48731. Как будет понятно специалисту в данной области, эпитопом может быть практически все, с чем антитело может специфично связываться. Эпитоп может содержать остатки, с которыми связывается антитело.

Термин "конформационный эпитоп" относится к эпитопу, в котором прерывающиеся аминокислоты объединяются в трехмерной конфигурации. В конформационном эпитопе точки взаимодействия располагаются среди аминокислотных остатков на белке, которые отделены друг от друга. В одном варианте осуществления эпитоп представляет собой эпитоп, описанный в разделе "Примеры" настоящего описания. В одном варианте осуществления конформационный эпитоп определяется (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 HER3 (домена 2) и (ii) аминокислотными остатками HER3 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) SEQ ID NO: 1 или их подмножеством. Как будет понятно специалисту в данной области, пространство, которое занято остатком или боковой цепью, которые создают форму молекулы, помогает определить то, что представляет собой эпитоп.

Как правило, антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на антигене-мишени в комплексной смеси белков и/или макромолекул.

Области данного полипептида, которые включают эпитоп, можно идентифицировать с использованием любого количества способов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы можно определять, например, путем одновременного синтеза на твердых подложках больших количеств пептидов, соответствующих частям молекулы белка, и реакции пептидов с антителами, когда пептиды все еще связаны с подложками. Такие способы известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002; Geysen et al., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:78-182; Geysen et al., (1986), *Mol. Immunol.* 23:709-715. Аналогично, конформационные эпитопы без труда идентифицируют путем определения пространственной конформации аминокислот, как, например, посредством водородно/дейтериевого обмена, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, *Epitope Mapping Protocols*, выше. Антигенные области белков также можно идентифицировать с использованием стандартных графиков антигенности и гидропатии, таких как графики, вычисляемые с использованием, например, программы Omega version 1.0, доступной от Oxford Molecular Group. В этой компьютерной программе используется способ Hopp/Woods, Hopp et al., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3824-3828; для определения профилей антигенности и способ Kyte-Doolittle, Kyte et al., (1982), *J. Mol. Biol.* 157:105-132; для графиков гидропатии.

Термин "паратоп", как используют в рамках изобретения, относится к общей структуре связывающей области, которая определяет связывание с эпитопом. Эта структура влияет на то, может ли связывающая область связываться с эпитопом, и каким образом она это делает. Паратоп может относиться к антигенному центру антитела, который ответственен за связывание антитела или его фрагмента с антигенной детерминантой. Также паратоп относится к идиотопу антитела и определяющей комплементарности области (CDR), которая связывается с эпитопом. В одном варианте осуществления паратоп представляет собой область антитела, которая связывается с конформационным эпитопом, содержащим (i) аминокислотные остатки 265-277 и 315 HER3 (домена 2) и (ii) аминокислотные остатки 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 HER3 (домена 4) SEQ ID NO: 1 или их подмножество. В одном варианте осуществления паратоп представляет собой область антитела, которая содержит последовательности CDR. В одном варианте осуществления паратоп содержит последовательности, приведенные в табл. 1. В одном варианте осуществления паратоп содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который связывается с остатками HER3: Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597. В одном варианте осуществления паратоп содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который связывается с остатками HER3: Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615. Как будет понятно специалисту в данной области, паратоп любого антитела или его вариант можно определять так, как указано в настоящем документе.

Выражения "моноклональные антитело" или "композиция моноклональных антител", как используют в рамках изобретения, относятся к полипептидам, включающим антитела, фрагменты антител, биспецифические антитела и т.д., которые имеют по существу идентичную аминокислотную последовательность или происходят из одного и того же генетического источника. Этот термин также включает препараты молекул антител с одинаковой молекулярной композицией. Композиция моноклонального антитела проявляет одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Выражение "антитело человека", как используют в рамках изобретения, включает антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области происходят из последовательностей, происходящих из человека. Более того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из таких последовательностей человека, например последовательностей человека эмбрионального типа, или мутантных версий последовательностей эмбрионального типа человека, или антитела, содержащего консенсусные последовательности каркасной области, полу-

ченые в анализе последовательностей каркасных областей человека, например, как описано в Knappik, et al. (2000), J. Mol. Biol. 296, 57-86). Структуры и расположение переменных доменов иммуноглобулинов, например CDR, можно определять с использованием хорошо известных схем нумерации, например схемы нумерации Kabat, схемы нумерации Chothia или комбинации Kabat и Chothia (см., например, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabat et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> edit., NIH Publication No. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989), Nature, 342:877-883; и Al-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273:927-948).

Антитела человека по этому изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, внесенные случайным или сайт-специфическим мутагенозом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*, или консервативная замена для обеспечения стабильности или производства).

Выражение "моноклональное антитело человека", как используют в рамках изобретения, относится к антителам, проявляющим одну специфичность связывания, которые обладают переменными областями, в которых каркасные области и области CDR происходят из последовательностей человека. В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного не являющегося человеком животного, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитую с иммортализованной клеткой.

Выражение "рекомбинантное антитело человека", как используют в рамках изобретения, включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулинов человека, или из гибридомы, полученной из него, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные другими способами, которые вовлекают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные области, в которых каркасные области или области CDR происходят из эмбриональных последовательностей иммуноглобулинов человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из эмбриональных последовательностей VH и VL человека и являются родственными им, могут не существовать в природе в эмбриональном наборе антител человека *in vivo*.

Специфическое связывание между двумя структурами означает связывание с константой ( $K_A$ ) ( $k_{on}/k_{off}$ ) по меньшей мере  $10^2 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  или меньшей мере  $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ .

Выражение "специфично (или селективно) связывается" с антителом (например, связывающим HER3 антителом) относится к реакции связывания, которая определяет присутствие распознаваемого антигена (например, HER3 человека) в гетерогенной популяции белков и других биологических соединений. В дополнение к константе равновесия ( $K_A$ ), указанной выше, связывающее HER антитело по изобретению, как правило, также имеет константу скорости диссоциации ( $K_D$ ) ( $k_{off}/k_{on}$ ), составляющую менее чем  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-2} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-3} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-4} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-5} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-6} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-7} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-8} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-9} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-10} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-11} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-12} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-13} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ , менее чем  $10^{-14} \text{ M}$ , менее чем  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  или менее чем  $10^{-15} \text{ M}$  или ниже, и связывается с HER3 с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, HSA).

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент имеет константу диссоциации ( $K_d$ ) менее чем 3000 пМ, менее чем 2500 пМ, менее чем 2000 пМ, менее чем 1500 пМ, менее чем 1000 пМ, менее чем 750 пМ, менее чем 500 пМ, менее чем 250 пМ, менее чем 200 пМ, менее чем 150 пМ, менее чем 100 пМ, менее чем 75 пМ, менее чем 10 пМ, менее чем 1 пМ при оценке с использованием способа, описанного в настоящем описании или известного специалисту в данной области (например, анализ BiAcore, ELISA, FACS, SET) (Biacore International AB, Uppsala, Швеция). Термин " $K_{assoc}$ " или " $K_a$ ", как используют в рамках изобретения, относится к скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, а термин " $K_{dis}$ " или " $K_d$ ", как используют в настоящем документе, относится к скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " $K_D$ ", как используют в настоящем документе, относится к константе диссоциации, которую получают из отношения  $K_d$  к  $K_a$  (т.е.  $K_d/K_a$ ), и ее выражают в качестве молярной концентрации (М). Значения  $K_D$  для антител можно определить с использованием способов, общепризнанных в данной области. Способом определения  $K_D$  антитела является способ с использованием поверхностного плазмонного резонанса или с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Термин "аффинность", как используют в рамках изобретения, относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных участках. В каждом антигенном участке варибельная область "плеча" антитела взаимодействует через слабые нековалентные силы с антигеном во множестве участков; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

Термин "авидность", как используют в рамках изобретения, относится к информативной мере общей стабильности или прочности комплекса антитело-антиген. Она контролируется тремя основными факторами: аффинность антитела к эпитопу; валентность как антигена, так и антитела и структурное расположение взаимодействующих частей. В конечном итоге эти факторы определяют специфичность антитела, т.е. вероятность того, что конкретное антитело связывается с определенным эпитопом антигена.

Термин "валентность", как используют в рамках изобретения, относится к количеству потенциальных связывающих мишень участков в полипептиде. Каждый связывающий мишень участок специфично связывает одну молекулу-мишень или определенный участок (т.е. эпитоп) на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного участка связывания мишени, каждый участок связывания мишени может специфично связываться одними и теми же или различными молекулами (например, может связываться с различными молекулами, например, различными антигенами или различными эпитопами на одной и той же молекуле).

Выражение "антитело-антагонист", как используют в рамках изобретения, относится к антителу, которое связывается с HER3 и нейтрализует биологическую активность передачи сигнала HER3, например снижает, уменьшает и/или ингибирует индуцируемую HER3 активность передачи сигнала, например, в анализе фосфо-HER3 или фосфо-Акт. Примеры анализов более подробно описаны в разделе "Примеры" ниже. Таким образом, следует понимать, что антитело, которое "ингибирует" одно или несколько из этих функциональных свойств HER3 (например, биохимическая, иммунохимическая, клеточная, физиологическая или другие виды биологической активности и т.п.) при определениях способами, известными в данной области и описанными в настоящем документе, связано со статистически значимым снижением конкретной активности относительно активности, наблюдаемой в отсутствие антитела (например, или когда присутствует контрольное антитело с несоответствующей специфичностью). Антитело, которое ингибирует активность HER3, достигает такого статистически значимого снижения измеряемого параметра, составляющего по меньшей мере 10%, по меньшей мере 50, 80 или 90%, и в определенных вариантах осуществления антитело по изобретению может ингибировать более 95, 98 или 99% функциональной активности HER3, о чем свидетельствует снижение уровня клеточного фосфорилирования HER3.

Выражение "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу свободно от других антител, обладающих отличающейся антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфично связывает HER3, по существу свободно от антител, которые специфично связывают антигены, отличные от HER3). Однако выделенное антитело, которое специфично связывает HER3, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов. Более того, выделенное антитело может быть по существу свободным от других клеточных материалов и/или химических веществ.

Выражение "консервативно модифицированный вариант" применимо как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, по существу к идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют любой данный белок. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определяется кодоном, кодон можно заменять на любой из соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновых кислот представляют собой

"молчащие варианты", которые являются только одним из типов консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, в каждой описанной последовательности подразумевается каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Для последовательностей полипептидов "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или вставки в последовательность полипептида, которые приводят к замене аминокислоты химически сходной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением к и не исключают полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей по изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг для 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)). В некоторых вариантах осуществления термин "консервативные модификации последовательности" используют для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Термины "перекрестно конкурировать" и "перекрестно конкурирующий" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения способности антитела или другого связывающего агента препятствовать связыванию других антител или связывающих агентов с HER3 в стандартном конкурентном анализе связывания.

Способность или степень, с которой антитело или другой связывающий агент способны препятствовать связыванию другого антитела или связывающего агента с HER3 и, таким образом, то, можно ли утверждать, что они перекрестно конкурируют в соответствии с изобретением, можно определять с использованием стандартных конкурентных анализов связывания. Один из пригодных анализов вовлекает применение технологии Biacore (например, с использованием устройства Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Швеция)), в которой можно измерять степень взаимодействий с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом анализе для измерения перекрестной конкуренции используется подход на основе ELISA.

Термин "оптимизированный", как используют в рамках изобретения, относится к нуклеотидной последовательности, которая изменена так, чтобы она кодировала аминокислотную последовательность с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в продуцирующей клетке или организме, как правило, эукариотической клетке, например клетке *Pichia*, клетке *Trichoderma*, клетке яичника китайского хомяка (CHO) или клетке человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют так, чтобы она полностью или насколько это возможно сохраняла аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как "родительская" последовательность.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении HER3 различных видов известны в данной области, включая, например, ELISA, вестерн-блоттинг и RIA. Пригодные анализы подробно описаны в примерах. Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценивать с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как анализ Biacore или анализ относительной аффинности FACS (Скэтчард). Анализы для оценки эффектов антител на функциональные свойства HER3 (например, анализы связывания рецептора, модулирование каскада HER) более подробно описаны в примерах.

Выражения "процентно идентичный" или "процентная идентичность" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности обладают указанным процентом аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 60% идентичностью, необязательно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью на протяжении указанной области, или, когда не указано, на протяжении всей последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения или намеченной области при определении с использованием одного из представленных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или путем выравнивания вручную и визуального исследования. Необязательно, идентичность существует на протяжении области, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно на протяжении области, которая имеет длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают анализируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей анализируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, обозначают координаты подпоследовательностей, если необходимо, и указывают параметры программы алгоритма для последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно назначать альтернативные параметры. Затем на основании параметров программы алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процентную идентичность последовательностей для анализируемой последовательности относительно контрольной последовательности.

"Окно сравнения", как используют в рамках изобретения, относится к сегменту любого из числа смежных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, как правило, от приблизительно 50 до приблизительно 200, более конкретно от приблизительно 100 до приблизительно 150, в которых последовательность может быть сравнена с контрольной последовательностью с таким же числом смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, посредством алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman (1970), *Adv. Appl. Math.* 2:482с, посредством алгоритма выравнивания по гомологии Needleman и Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:443, посредством поиска сходства способом Pearson и Lipman, (1988), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444, с помощью компьютеризованного исполнения этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или посредством выравнивания вручную и визуального исследования (см., например, Brent et al., (2003), *Current Protocols in Molecular Biology*).

Двумя примерами алгоритмов, которые пригодны для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., (1977), *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; и Altschul et al., (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410 соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм включает первичную идентификацию пар последовательностей с максимальным сходством (HSP) посредством идентификации коротких слов с длиной  $W$  в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому оцениваемому положительно порогу значения  $T$  при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных.  $T$  определяется как порог значений для соседних слов (Altschul et al., выше). Эти изначальные совпадения соседних слов выступают в роли предшественников для начала поиска при обнаружении более длинных HSP, содержащих их. Поиск совпадений слов распространяется в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока суммарное значение для выравнивания может повышаться. Суммарные значения вычисляются с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров  $M$  (значение компенсации за пару совпавших остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (значение штрафа за несовпадение остатков; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей для вычисления суммарного значения используется оценочная матрица. Продолжение поиска совпадений слов в каждом направлении останавливают, если суммарное значение для выравнивания снижается по величине  $X$  ниже максимально достижимого значения; суммарное значение снижается до нуля или ниже при накоплении одного или нескольких выровненных остатков с отрицательным значением или если достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует в качестве параметров по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидаемое значение ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует в качестве параметров по умолчанию длину слова 3 и ожидаемые значения ( $E$ ) 10 и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:10915), фрагменты для выравнивания ( $B$ ) 50, ожидаемое значение ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787). Один способ определения сходства, обеспечиваемый алгоритмом BLAST, представляет собой наименьшую суммарную вероятность ( $P(N)$ ), которая предоставляет указание вероятности, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайным образом. Например, нуклеиновая кислота рассматривается как сходная с контрольной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении анализируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем приблизительно 0,2, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

Процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller ((1988), *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17), который включен в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы веса остатков PAM120, штрафа за продолжение пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Кроме того, процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Needleman и Wunsch ((1970), *J. Mol. Biol.* 48:444-453), который включен с программу GAP в пакете программ GCG

(доступном на <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за пропуск 16, 14, 12, 10, 8, 6, или 4 и штрафа за продолжение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо процента идентичности последовательности, указанного выше, другим показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот или два полипептида по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с антителами, индуцированными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является по существу идентичным второму полипептиду, например, где два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, является то, что эти две молекулы или комплементарные им последовательности гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, является то, что для амплификации их последовательностей можно использовать одни и те же праймеры.

Выражение "нуклеиновая кислота" используется в настоящем описании взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид", и оно относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки остова или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые обладают сходными связывающими свойствами с эталонной нуклеиновой кислотой и которые метаболизируются аналогично эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, но не ограничиваются ими, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидно-нуклеиновые кислоты (PNA).

Если нет иных указаний, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную прямо. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов можно проводить путем получения последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанных оснований и/или остатками дезоксиинозина (Batzer et al., (1991), *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al., (1985), *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; и Rossolini et al., (1994), *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98).

Выражение "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, оно относится к функциональной взаимосвязи последовательности регуляции транскрипции с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой экспрессирующей системе. Как правило, промоторные последовательности регуляции транскрипции, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются цис-регуляторными. Однако некоторые последовательности регуляции транскрипции, такие как энхансеры, не должны быть физически смежными или расположенными вблизи кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают.

Термины "полипептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Эти термины применимы к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам аминокислот и не встречающимся в природе полимерам аминокислот. Если нет иных указаний, конкретная полипептидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

Термин "индивидуум" включает человека и не являющихся человеком животных. Не являющиеся человеком животные включают всех позвоночных, например, являющихся млекопитающими и не являющихся млекопитающими, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и пресмыкающиеся. Если нет иных указаний, термины "пациент" или "индивидуум" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.

Термин "средство против злокачественной опухоли" означает любое средство, которое можно использовать для лечения клеточно-пролиферативного нарушения, такого как злокачественная опухоль, включая цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и радиоактивные терапевтические средства, нацеленные средства против злокачественной опухоли и иммунные терапевтические средства.

"Опухоль" относится к неопластическому росту и пролиферации клеток, как злокачественным, так и доброкачественным, и ко всем предзлокачественным и злокачественным клеткам и тканям.

Термин "противоопухолевая активность" означает снижение скорости пролиферации, жизнеспособности или метастатической активности клеток опухоли. Возможным путем показания противоопухо-

левой активности является показание снижения скорости роста аномальных клеток вследствие терапии или стабильности или снижения размера опухоли. Такую активность можно оценивать с использованием общепринятых моделей опухолей *in vitro* или *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, модели с ксенотрансплантатами, модели с аллотрансплантатами, модели MMTV и другие модели, известные в данной области, для исследования противоопухолевой активности.

Термин "злокачественное новообразование" относится к недоброкачественной опухоли или к злокачественной опухоли. Как используют в рамках настоящего изобретения, термин "злокачественная опухоль" включает злокачественное новообразование, характеризующееся нарушенной регуляцией роста клеток или неконтролируемым ростом клеток. Иллюстративные злокачественные опухоли включают карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы. Термин "злокачественная опухоль" включает первичные злокачественные опухоли (например, опухоли, клетки которых не мигрировали в области организма индивидуума, отличные от исходной опухоли) и вторичные злокачественные опухоли (например, опухоли, возникающие вследствие метастаза - миграции опухолевых клеток во вторичные области, которые отличаются от области исходной опухоли).

Различные аспекты изобретения описаны более подробно в последующих разделах и подразделах.

Структура и механизм активации рецепторов HER.

Все четыре рецептора HER имеют внеклеточный лигандсвязывающий домен, один трансмембранный домен и цитоплазматический содержащий тирозинкиназу домен.

Внутриклеточный тирозинкиназный домен рецепторов HER является высококонсервативным, хотя киназный домен HER3 содержит замены критических аминокислот и, таким образом, лишен киназной активности (Guy et al., (1994), PNAS 91, 8132-8136). Индуцируемая лигандом димеризация рецепторов HER индуцирует активацию киназы, трансфосфорилирование рецептора по остаткам тирозина на С-конце, а затем привлечение и активацию эффекторов внутриклеточной передачи сигнала (Yarden and Sliwkowski, (2001), Nature Rev 2, 127-137; Jorissen et al., (2003), Exp Cell Res. 284, 31-53).

Кристаллические структуры внеклеточных доменов HER обеспечили некоторое понимание процесса индуцируемой лигандом активации рецептора (Schlessinger, (2002), Cell 110, 669-672). Внеклеточный домен каждого рецептора HER состоит из четырех субдоменов: субдомены I и III объединяются, образуя лигандсвязывающий участок, в то время как субдомен II (и, возможно, также субдомен IV) участвуют в димеризации рецептора посредством прямых рецептор-рецепторных взаимодействий. В структурах связанного с лигандом HER1,  $\beta$ -шпилька (называемая петлей димеризации) в субдомene II взаимодействует с петлей димеризации в рецепторе-партнере, опосредующей димеризацию рецептора (Garrett et al, (2002), Cell 110, 763-773; Ogiso et al., (2002), Cell 110, 775-787). Напротив, в структурах неактивного HER1, HER3 и HER4 петля димеризации вовлечена во внутримолекулярные взаимодействия с субдоменом IV, которые препятствуют димеризации рецептора в отсутствие лиганда (Cho and Leahy, (2002), Science, 297, 1330-1333; Ferguson et al., (2003), Mol. Cell 12, 541-552; Wouyan et al., (2005), PNAS, 102, 15024-15029). Структура HER2 является уникальной среди HER. В отсутствие лиганда HER2 имеет конформацию, которая напоминает активированное лигандом состояние HER1 с выступающей петлей димеризации, доступную для взаимодействия с другими рецепторами HER (Cho et al., (2003), Nature, 421, 756-760; Garrett et al., (2003), Mol. Cell 11, 495-505). Это может объяснить усиленную способность HER2 к гетеродимеризации.

Хотя кристаллические структуры рецептора HER обеспечивают модель для гомо- и гетеродимеризации рецептора HER, предпосылки для преобладания некоторых гомо- и гетеродимеров HER над другими (Franklin et al., (2004), Cancer Cell 5, 317-328), а также конформационная роль каждого домена в димеризации и аутоингибировании рецептора (Burgess et al., (2003), Mol. Cell 12, 541-552; Mattoon et al., (2004), PNAS 101, 923-928) остаются в некоторой степени неясными. Как описано ниже, рентгеновская кристаллическая структура HER3 обеспечивает больше информации.

Структура и конформационные эпитопы HER3.

В рамках настоящего изобретения предусматривается конформационный эпитоп, с которым связываются антигенсвязывающие белки, например антитела против HER3. Впервые показана трехмерная структура укороченной формы (остатки 20-640) внеклеточного домена HER3 в комплексе с антителом. Комплекс HER3-Fab MOR09823 и HER3-MOR09825 были определены при разрешении 3,2 и 3,4 Å соответственно и представлены на фиг. 5А. Также в настоящем описании впервые показано антитело или его фрагмент, которые связываются с неактивным состоянием HER3 и стабилизируют рецептор в неактивном состоянии. Антитела по изобретению также допускают одновременное связывание лиганда HER3, такого как нейрорегулин, с рецептором HER3.

Без связи с теорией, одной возможной моделью механизма действия является то, что HER3, как правило, существует в неактивном (закрытом, ограниченном) или активном (открытом) состоянии. Связывание лиганда индуцирует конформационное изменение, так что HER3 существует в активном (открытом) состоянии, в котором он способен связывать партнеров по гетеродимеру, что приводит к активации последующей передачи сигнала. Антитела, такие как MOR09823, связывают HER3 в неактивном (ограниченном) состоянии, но не блокируют участок связывания лиганда. Антитела, такие как MOR09823, ингибируют HER3 путем предотвращения индуцируемых лигандом структурных перестроек, требуемых

для перехода HER3 в активную конформацию, тем самым препятствуя передаче сигнала. В одном варианте осуществления антитела по изобретению или их фрагменты связывают HER3 в неактивном (ограниченном) состоянии, но не блокируют участок связывания лиганда. В другом варианте осуществления антитела или их фрагменты ингибируют HER3 путем предотвращения индуцируемых лигандом структурных перестроек, требуемых для перехода HER3 в активную конформацию, тем самым препятствуя передаче сигнала. В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент стабилизируют (прямо поддерживают, запирают, ограничивают, удерживают, предпочтительно связывают, способствуют) рецептор HER3 в неактивном состоянии или конформации. В одном варианте осуществления неактивный рецептор HER3 может быть подвержен преимущественной интернализации или деградации, так что он приводит к утрате рецепторов HER3 на клеточной поверхности. Эти варианты осуществления основаны на биологических данных, представленных в разделе "Примеры".

Кристаллы HER3 можно получать посредством экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей HER3, или ее варианта в подходящей клетке-хозяине, а затем кристаллизации очищенного белка(ов) в присутствии соответствующего Fab, нацеленного на HER3. Предпочтительно полипептид HER3 содержит внеклеточный домен (аминокислоты 20-640 полипептида человека или его укороченной версии, предпочтительно содержащей аминокислоты 20-640), но лишен трансмембранного и внутриклеточного доменов.

Полипептиды HER3 также можно получать в качестве слитых белков, например, для облегчения экстракции и очистки. Примеры партнеров в слитом белке включают глутатион-S-трансферазу (GST), гистидин (HIS), гексагистидин (6HIS), GAL4 (связывающие ДНК и/или активирующие транскрипцию домены) и бета-галактозидазу. Может быть удобным включение участка протеолитического расщепления между партнером в слитом белке и представляющей интерес белковой последовательностью для обеспечения удаления последовательностей слитых белков.

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

Белок(и) можно кристаллизовать с использованием способов, описанных в настоящем документе. Обычно в процессе кристаллизации каплю, содержащую раствор белка, смешивают с буфером для кристаллизации и позволяют им уравновеситься в закрытом контейнере. Уравновешивания можно достигать известными способами, такими как способ "висячей капли" или "сидячей капли". В этих способах каплю подвешивают над или помещают рядом со значительно более крупным резервуаром с буфером для кристаллизации, и уравнивание достигается посредством диффузии пара. Альтернативно, уравнивание может происходить посредством других способов, например под маслом, через полупроницаемую мембрану или путем свободной диффузии через поверхность контакта (см., например, Chayen et al., (2008), *Nature Methods*, 5, 147-153).

После получения кристаллов структуру можно решать известными способами рентгенодифракции. Во многих способах используются химически модифицированные кристаллы, такие как кристаллы, модифицированные путем дериватизации тяжелыми атомами для сближения фаз. На практике, кристалл погружают в раствор, содержащий соли атомов тяжелых металлов или металлоорганические соединения, например хлорид свинца, тиомалат золота, тимерсал или уранилацетат, которые могут диффундировать через кристалл и связываться с поверхностью белка. Затем можно определять положение(я) связавшегося атома(ов) тяжелого металла рентгенодифракционным анализом погруженного кристалла. Профили, полученные при дифракции монохроматического пучка рентгеновских лучей атомами (центры рассеяния) кристаллического кристалла, можно решать посредством математических уравнений с получением математических координат. Данные дифракции используют для вычисления карты электронной плотности повторяющегося элемента кристалла. Другим способом получения информации о фазах является использование способа, известного как молекулярное замещение. В этом способе применяют алгоритмы вращения и сдвига для поиска модели, происходящей из родственной структуре, с получением приблизительной ориентации для представляющего интерес белка (См. Rossmann, (1990), *Acta Crystals A* 46, 73-82). Карты электронной плотности используют для установления положений индивидуальных атомов в единичной ячейке кристалла (Blundel et al., (1976), *Protein Crystallography*, Academic Press).

В настоящем документе впервые описана трехмерная структура HER3 и Fab антитела против HER3. Приблизительные границы внеклеточных доменов HER3 являются следующими: 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 также позволяет идентификацию участков связывания мишени для потенциальных модуляторов HER3. Предпочтительными участками связывания мишени являются участки, вовлеченные в активацию HER3. В одном варианте осуществления участок связывания мишени расположен в домене 2 и домене 4 HER3. Таким образом, антитело или его фрагмент, которые связываются либо с доменом 2, либо с доменом 4 и предпочтительно с обоими доменами, могут модулировать активацию HER3 либо путем предотвращения диссоциации доменов друг от друга, либо путем модификации относительных положений доменов. Таким образом, связывание антитела или его фрагмента с аминокислотными остатками в домене 2 или домене 4 может вызывать преобразование белка в конформацию, которая препятствует активации. В настоящем описании также впервые продемонстриро-



ваны антитело или его фрагмент, которые могут одновременно связываться с лигандом HER3, таким как нейрорегулин.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент распознают определенное конформационное состояние HER3, так что антитело или его фрагмент препятствуют взаимодействию HER3 с корецептором (включая, но не ограничиваясь ими, HER1, HER2 и HER4). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент препятствуют взаимодействию HER3 с корецептором путем стабилизации рецептора HER3 в неактивном или закрытом состоянии. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент стабилизируют рецептор HER3 посредством связывания с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 HER3. В этом неактивном состоянии петля димеризации, расположенная в домене 2, не открывается и, таким образом, не доступна для димеризации с другими корецепторами (включая, но не ограничиваясь ими, HER1, HER2 и HER4). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с белком HER3 человека, имеющим конформационный эпитоп, содержащий (i) аминокислотные остатки 265-277 и 315 (домена 2) HER3 и (ii) аминокислотные остатки 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 SEQ ID NO: 1 или их подмножество. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с аминокислотами, находящимися в пределах или перекрывающихся с (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 (домена 2) и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с (i) аминокислотами (и/или аминокислотными последовательностями, состоящими из) в пределах аминокислот 265-277 и 315 (домена 2) и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 SEQ ID NO: 1 или их подмножеством. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с конформационным эпитопом, так что это ограничивает подвижность домена 2 и домена 4, стабилизируя его в неактивной или закрытой конформации. Невозможность образования активной конформации приводит к невозможности активации передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с конформационным эпитопом, так что это закрывает петлю димеризации в домене 2, что тем самым делает ее недоступной для рецептор-рецепторного взаимодействия.

Невозможность образования гомо- или гетеродимеров приводит к невозможности активации передачи сигнала.

В другом аспекте антитело или его фрагмент связывают конформационный эпитоп рецептора HER, такого как рецептор HER3. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент стабилизируют рецептор HER3 в неактивном состоянии. В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связываются с рецептором HER3 в активном состоянии и преобразуют его в неактивное состояние. Таким образом, антитело или его фрагмент могут связываться с HER3 либо в активном, либо в неактивном состоянии, но способствуют формированию неактивного состояния и переводят HER3 в активном состоянии в неактивное состояние, что приводит к невозможности активации передачи сигнала.

В другом аспекте антитело или его фрагмент связывают конформационный эпитоп рецептора HER, такого как рецептор HER3, где связывание антитела или его фрагмента стабилизирует рецептор HER3 в неактивном состоянии, так что рецептор HER3 не может димеризоваться с корецептором с образованием рецептор-рецепторного комплекса. Невозможность образования рецептор-рецепторного комплекса препятствует активации как лиганд-зависимой, так и лиганд-независимой передачи сигнала.

В другом аспекте антитело или его фрагмент связывают конформационный эпитоп рецептора HER, такого как рецептор HER3, где связывание антитела или его фрагмента с рецептором HER3 позволяет димеризацию с корецептором с образованием неактивного рецептор-рецепторного комплекса. Образование неактивного рецептор-рецепторного комплекса препятствует активации лиганд-независимой передачи сигнала. Например, при лиганд-независимой передаче сигнала HER3 может существовать в неактивном состоянии, однако сверхэкспрессия HER2 обеспечивает образование комплекса HER2-HER3, однако эти полученные комплексы являются неактивными и препятствуют активации лиганд-независимой передачи сигнала.

Представленная структура также позволяет идентифицировать определенные основные аминокислотные остатки HER3 для поверхности взаимодействия антитела или его фрагмента (например, MOR09823) с HER3. Они были определены как остатки, которые находятся в пределах 5 Å от VH-цепи белка MOR09823. Основные остатки являются следующими: Asn266, Lys267, Leu268, Thr269, Gln271, Glu273, Pro274, Asn275, Pro276, His277, Asn315, Asp571, Pro583, His584, Ala596, Lys597.

Структуры также можно использовать для идентификации пограничных аминокислотных остатков HER3 для поверхности взаимодействия с антителом или его фрагментом (например, MOR09823). Эти остатки могут представлять собой остатки HER3, которые находятся в пределах 5-8 Å от VH-цепи белка MOR09823. Пограничные остатки являются следующими: Pro262, Val264, Tyr265, Phe270, Leu272, Thr278, Lys314, Gly316, Glu321, Asn566, Ser568, Gly569, Ser570, Thr572, Arg580, Asp581, Gly582, Gly595, Gly598, Ile600.

Представленная структура также позволяет идентифицировать определенные основные аминокислотные остатки HER3 для поверхности взаимодействия антитела или его фрагмента (например,

MOR09823) с HER3. Они были определены как остатки, которые находятся в пределах 5 Å от VL-цепи белка MOR09823. Основные остатки являются следующими: Tyr265, Lys267, Leu268, Phe270, Gly582, Pro583, Lys597, Ile600, Lys602, Glu609, Arg611, Pro612, Cys613, His614, Glu615.

Структуры также были использованы для идентификации пограничных аминокислотных остатков HER3 для поверхности взаимодействия с антителом или его фрагментом (например, MOR09823). Эти остатки представляли собой остатки HER3, которые находились в пределах 5-8 Å от VL-цепи белка MOR09823. Пограничные остатки являются следующими: Asn266, Thr269, Asp571, Arg580, Asp581, His584, Pro590, Ala596, Pro599, Tyr601, Tyr603, Asp605, Gln607, Cys610, Asn616, Cys617, Cys621, Gly623, Pro624.

Как можно видеть в табл. 11 и 12 (MOR09823) и в табл. 13 и 14 (MOR09825) соответственно, тяжелая цепь в основном вовлечена в связывание антигенсвязывающего белка с аминокислотными остатками в домене 2 эпитопа при меньшем взаимодействии с аминокислотными остатками домена 4, в то время как легкая цепь в основном вовлечена в связывание с аминокислотными остатками в домене 4 эпитопа при меньшем взаимодействии с аминокислотными остатками в домене 2.

Соответственно, специалист в данной области, учитывая представленные указания, может предсказать, какие остатки и области антигенсвязывающих белков можно варьировать без чрезмерного препятствования способности антигенсвязывающего белка связываться с HER3.

Основные аминокислоты поверхности взаимодействия определяли как представляющие собой все аминокислотные остатки, в которых по меньшей мере один атом находится на расстоянии, меньшем или равном 5 Å, от белка-партнера HER3. 5 Å было выбрано в качестве порогового расстояния для основной области, чтобы предусмотреть атомы в пределах ван-дер-ваальсова радиуса плюс возможная опосредуемая водой водородная связь. Пограничные аминокислоты поверхности взаимодействия были определены как все аминокислотные остатки по меньшей мере с одним атомом на расстоянии, меньшем или равном 8 Å от белка-партнера HER3, но не включенные в перечень основных взаимодействий.

В некоторых вариантах осуществления любой антигенсвязывающий белок, который связывает, защищает или предупреждает взаимодействие MOR09823 с любым из описанных выше остатков, можно использовать для связывания или нейтрализации HER3. В некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты связываются или взаимодействуют 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. В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты связываются и взаимодействуют 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. В некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты связываются или взаимодействуют с по меньшей мере 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. В некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты связываются или взаимодействуют с комбинацией 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. В некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты связываются или взаимодействуют со 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. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент находятся в пределах 5 Å от одного или нескольких из указанных выше остатков. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент находятся в пределах 5-8 Å от одного или нескольких из указанных выше остатков. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент взаимодействуют, блокируют или находятся 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 из указанных выше остатков.

Доступность 3D-структур для HER3 и комплекса HER3:MOR09823, например, обеспечивает каркас для более детального исследования других антител против HER3. 3D-структура HER3 позволяет картирование эпитопов моноклональных антител и установление их механизма действия, поскольку некоторые из них ингибируют, некоторые стимулируют, а другие не имеют эффекта на рост клеток. Локализация конформационного эпитопа для MOR09823 была определена в доменах 2 и 4 HER3. Доступность 3D-структур этого рецептора облегчит определение точного механизма действия этих ингибиторных средств и разработку новых подходов для предотвращения функции рецептора HER3. В одном варианте осуществления антитела по изобретению связываются с тем же конформационным эпитопом, что и MOR09823.

В некоторых вариантах осуществления конформационный эпитоп, связываемый любым из антител, приведенных в табл. 1, является особенно пригодным. В определенных вариантах осуществления конформационный эпитоп HER3 можно использовать для выделения антител или их фрагментов, которые

связываются с HER3. В определенных вариантах осуществления конформационный эпитоп HER3 можно использовать для получения антител или их фрагментов, которые связываются с HER3. В определенных вариантах осуществления конформационный эпитоп HER3 можно использовать в качестве иммуногена для получения антител или их фрагментов, которые связываются с конформационным эпитопом HER3. В определенных вариантах осуществления конформационный эпитоп HER3 можно вводить животному, а затем из животного можно получать антитела, которые связываются с HER3.

В некоторых вариантах осуществления домен(ы)/область(и), содержащие остатки, которые находятся в контакте с или заглубляются в антитело, можно идентифицировать путем внесения мутации в конкретные остатки в HER3 (например, антиген дикого типа) и определения того, может ли антитело или его фрагмент связываться с мутантом или вариантом белка HER3, или измерения изменения аффинности относительно дикого типа. Путем внесения ряда индивидуальных мутаций можно идентифицировать остатки, которые играют прямую роль в связывании или которые находятся достаточно близко к антителу, так что мутация может влиять на связывание антитела и антигена. Исходя из информации об этих аминокислотах, можно устанавливать домен(ы) или область(и) антигена (HER3), которые содержат остатки, контактирующие с антителом или заглубляющиеся в антитело. Мутагенез с использованием известных способов, таких как сканирование аланином, может помочь определить функционально значимые эпитопы. Также можно использовать мутагенез с использованием протокола сканирования с аргинином/глутаминовой кислотой (см., например, Nanevicz et al., (1995), J. Biol. Chem. 270(37):21619-21625 и Zupnick et al., (2006), J. Biol. Chem. 281(29):20464-20473). Как правило, аргинином и глутаминовой кислотой заменяют (как правило, по отдельности) аминокислоту в полипептиде дикого типа, поскольку эти аминокислоты являются заряженными и объемными и, таким образом, обладают потенциалом к нарушению связывания между антигенсвязывающим белком и антигеном в области антигена, в которую внесена мутация. Остатки аргинина, которые существуют в антигене дикого типа, заменяют глутаминовой кислотой. Можно получать множество таких индивидуальных мутантов и анализировать полученные результаты связывания для определения того, какие остатки влияют на связывание. Можно создавать серию мутантных антигенов HER3, причем каждый мутантный антиген имеет одну мутацию. Связывание каждого мутантного антигена HER3 с различными антителами против HER3 или их фрагментами можно измерять и сравнивать со способностью выбранного антитела или его фрагментов связывать HER3 дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Изменение (например, снижение или увеличение) связывания между антителом или его фрагментом и мутантом или вариантом HER3, как используют в рамках изобретения, означает, что существует изменение аффинности связывания (например, при измерении известными способами, такими как исследование Вiasoge или анализ на основе гранул, описанный ниже в примерах),  $EC_{50}$ , и/или изменение (например, снижение) общей связывающей способности антигенсвязывающего белка (например, о чем свидетельствует снижение  $B_{max}$  на графике концентрации связывающего белка против концентрации антигена). Значительное изменение связывания указывает на то, что мутантный остаток вовлечен в связывание с антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления значительное снижение связывания означает, что аффинность связывания,  $EC_{50}$  и/или способность связывания между антителом или его фрагментами и антителом и мутантным антигеном HER3 снижена приблизительно на более чем 10%, более чем 20%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 55%, более чем 60%, более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90% или более чем 95% относительно связывания между антителом или его фрагментом и HER3 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления связывание антитела или его фрагментов значительно снижено или увеличено в отношении мутантного белка HER3, имеющего одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) мутаций по сравнению с белком HER3 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1).

Хотя формы вариантов упоминаются в отношении последовательности дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 1, будет понятно, что в аллельных вариантах HER3 или вариантах HER3 по сплайсингу аминокислоты могут отличаться. Также предусматриваются антитела или их фрагменты, демонстрирующие значительно измененное связывание (например, более низкое или более высокое связывание) с такими аллельными формами HER3.

В дополнение к общим структурным аспектам антител, более специфическое взаимодействие между паратопом и эпитопом можно исследовать с помощью структурных подходов. В одном варианте осуществления структура CDR участвует в паратопе, через который антитело способно связываться с эпитопом. Форму такого паратопа можно определять рядом способов. Можно использовать традиционные подходы структурного исследования, такие как ЯМР или рентгеновская кристаллография. Эти подходы могут исследовать форму паратопа отдельно или в связанном с эпитопом состоянии. Альтернативно, можно создавать молекулярные модели *in silico*. Структуру можно получать посредством моделирования гомологии с помощью коммерческого пакета программ, такого как пакет для моделирования InsightII от Accelrys (San Diego, Calif.). В кратком изложении, можно использовать последовательность антитела, подлежащего исследованию, для поиска против базы данных белков с известными структурами, такой

как Protein Data Bank. После идентификации гомологичных белков с известными структурами эти гомологичные белки используют в качестве матриц для моделирования. Каждую из возможных матриц можно выравнивать, таким образом получая выравнивание последовательностей на основе структур среди матриц. Затем последовательность антитела с неизвестной структурой можно выравнивать с этими матрицами, получая молекулярную модель для антитела с неизвестной структурой. Как будет понятно специалисту в данной области, существует множество альтернативных способов получения таких структур *in silico*, любую из которых можно использовать. Например, можно использовать способ, сходный со способом, описанным в Hardman et al., выданный патент США № 5958708 с использованием QUANTA (Polygen Corp., Waltham, Mass.) и CHARM (Brooks et al., (1983), J. Comp. Chem. 4:187) (включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

При определении того, будет ли и насколько хорошо возможный паратоп будет связываться с эпитопом, важна не только форма паратопа, но и само взаимодействие между эпитопом и паратопом является источником существенной информации при конструировании вариантов антител. Как понятно специалисту в данной области, существует множество способов, посредством которых можно исследовать это взаимодействие. Одним способом является использование полученной структурной модели, возможно, как описано выше, а затем использование программы, такой как InsightII (Accelrys, San Diego, Calif.), которая имеет стыковочный модуль, который, среди прочего, способен выполнять поиск по принципу Монте-Карло конформационных и ориентационных пространств между паратопом и его эпитопом. Результатом является то, что можно оценить, где и как эпитоп взаимодействует с паратопом. В одном варианте осуществления используют только фрагмент или вариант эпитопа для облегчения определения соответствующих взаимодействий. В другом варианте осуществления целый эпитоп используют при моделировании взаимодействия между паратопом и эпитопом.

Используя эти смоделированные структуры, можно предсказать, какие остатки наиболее важны для взаимодействия между эпитопом и паратопом. Таким образом, в одном варианте осуществления можно без труда выбрать, какие остатки изменить для изменения характеристик связывания антитела. Например, из стыковочных моделей может быть очевидно, что боковые цепи определенных остатков в паратопе могут пространственно препятствовать связыванию эпитопа, и таким образом, изменение этих остатков на остатки с меньшими боковыми цепями может быть полезным. Это можно определять множеством способов. Например, можно просто изучить две модели и оценить взаимодействия на основе функциональных групп и близости. Альтернативно, можно проводить повторное образование пар эпитопа и паратопа, как описано выше, для получения более энергетически благоприятных взаимодействий. Также можно определять эти взаимодействия для различных вариантов антитела в целях определения альтернативных способов, посредством которых антитело может связываться с эпитопом. Также можно комбинировать различные модели для определения того, как следует изменить структуру антител для получения антитела с конкретными желательными характеристиками.

Определенные выше модели можно исследовать различными способами. Например, с помощью программ, описанных выше, можно определять энергию взаимодействия для определения того, какой из вариантов исследовать далее. Также для определения энергии взаимодействия эпитопа и вариантов паратопов используют кулоновские и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Также используют сайт-направленный мутагенез, чтобы определить, действительно ли предсказанные изменения в структуре антитела приводят к желательным изменениям характеристик связывания. Альтернативно, изменения можно вносить в эпитоп для подтверждения того, что модели являются правильными, или для определения общих связывающих мотивов, которые могут встречаться между паратопом и эпитопом.

Как будет понятно специалисту в данной области, хотя эти модели обеспечивают информацию, необходимую для получения антител и их вариантов согласно настоящим вариантам осуществления, все еще может быть желательным проведение стандартного исследования моделей *in silico*, возможно, посредством исследований *in vitro*. Кроме того, как будет понятно специалисту в данной области, любая модификация также может иметь дополнительные побочные эффекты на активность антитела. Например, в то время как любое изменение, для которого предсказано, что оно приведет к более высокому связыванию, может индуцировать более высокое связывание, оно также может вызывать другие структурные изменения, которые могут снизить или изменить активность антитела. Определение того, соответствует ли это действительности, является стандартным в данной области, и его можно осуществлять множеством способов. Например, активность можно исследовать с помощью исследования ELISA. Альтернативно, образцы можно исследовать с использованием устройства для поверхностного плазмонного резонанса.

#### Антитела против HER3.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые распознают конформационный эпитоп HER3. Изобретение основано на неожиданном открытии, что класс антител против HER3 блокирует каскады как лиганд-зависимой, так и лиганд-независимой передачи сигнала HER3. Класс антител, который связывается с конкретным конформационным эпитопом HER3, описан в табл. 1. В одном варианте осуществления антитела ингибируют как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала HER3. В другом варианте осуществления антитела связываются с HER3 и не блокируют связывание лиганда HER с участком связывания лиганда (т.е. как лиганд, так и антитело могут связывать HER3 одно-

временно).

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связывают белок HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака), причем указанные антитела содержат VH-домен, имеющий аминокислотную последовательность 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. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связывают белок HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака), причем указанные антитела содержат VL-домен, имеющий аминокислотную последовательность 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. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака), причем указанные антитела содержат CDR VH, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенных в табл. 1. В частности, изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака), причем указанные антитела содержат (или альтернативно, состоят из) одну, две, три, четыре, пять или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенных в табл. 1.

Другие антитела по изобретению включают аминокислоты, в которые были внесены мутации, но которые все еще обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью в областях CDR с областями CDR, представленными в последовательностях, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в областях CDR внесены мутации по сравнению с областями CDR, представленными в последовательности, описанными в табл. 1, тем не менее с сохранением их специфичности в отношении эпитопа исходного антитела.

Другие антитела по изобретению включают аминокислоты, в которые были внесены мутации, но которые все еще обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью в каркасных областях с каркасными областями, представленными в последовательностях, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более чем в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот внесены мутации в каркасных областях по сравнению с каркасными областями, представленными в последовательностях, описанных в табл. 1, тем не менее с сохранением их специфичности в отношении эпитопа исходного антитела. Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полную размерную тяжелую цепь и полную размерную легкую цепь антител, которые специфично связываются с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака).

Антитела против HER3 по изобретению связываются с конформационным эпитопом HER3, содержащим аминокислотные остатки из домена 2 и домена 4 HER3.

Таблица 1

Примеры антител против HER3 по настоящему изобретению

НОМЕР SEQ ID	Область Аб	
MOR09823		
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRITYYPDSVKG
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 5 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 6 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 7 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 8 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 9 (Chothia)	HCDR2	GAVGR
SEQ ID NO: 10 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI

SEQ ID NO: 11 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 12 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: (Chothia) 13	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 14	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYQCQQYSSFPSTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 15	VH	QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGRTYYPSVKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARWGD EGFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 16	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGTGC TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCCTTTTAGCGGCTCTGGATCCGCG ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGT TATTATTGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGTACG AAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 17	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGGCCTGGTGCAACCGGCGGCAGC CTGCGCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTACT GGTGCTGTTGGTCTACTTATTATCCTGATTCTGTAAAGGTCGTTTTACC ATTTACCGTGATAATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCGGCTTGGGGTGATGAGGGT TTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 18	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYQCQQYSSFPSTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGRTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR09824</b>		
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	HCDR2	VISAWGHVKYYADSVKG
SEQ ID NO: 22 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 23 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 24 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 25 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 26 (Chothia)	HCDR1	GTFSSY
SEQ ID NO: 27 (Chothia)	HCDR2	SAWGHV
SEQ ID NO: 28 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 30 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 31 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT

SEQ ID NO: 32	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYQCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 33	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTLVTVSS
SEQ ID NO: 34	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATGGTGCCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCCTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTAATGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACG AAAGTTGAAATTTAAA
SEQ ID NO: 35	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATT TCTGCTTGGGTCATGTTAAGTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTT ACCATTTACAGTATAATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGCGTGCAGGAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGGGTGTAGAG GGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 36	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYQCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 37	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR09825</b>		
SEQ ID NO: 38 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	HCDR2	AINSQGKSTYYADSVKG



SEQ ID NO: 40 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 41 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 42 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 43 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 44 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 45 (Chothia)	HCDR2	NSQGKS
SEQ ID NO: 46 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 47 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 48 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 49 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 50	VL	DIQMTQSESSLASVGDVRTITCRASQGISNWLAWYQQKFGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPTTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 51	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 52	ДHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATGGTGTCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTATTGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACG AAAGTTGAAATTA

SEQ ID NO: 53	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATT AATTCTCAGGGTAAGTCTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTT ACCATTTACGTAATAATCGAAAAACCCCTGTATCTGCAATGAACAGC CTGCGTGCAGGATAACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTTGGGGTATGAG GGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 54	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYQCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 55	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQ GKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYF LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR09974</b>		
SEQ ID NO: 56 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 57 (Kabat)	HCDR2	VINPSGNFTNYADSVKG
SEQ ID NO: 58 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 59 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 60 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 61 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
SEQ ID NO: 62 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 63 (Chothia)	HCDR2	NPSGNF

SEQ ID NO: 64 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 65 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 66 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 67 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 68	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 69	VH	QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV INPSGFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 70	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATGGTGCCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCCTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTATTGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGTACG AAAGTTGAAATTTAAA
SEQ ID NO: 71	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATT AATCCTTCTGGTAATTTTACTAATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTTTTT ACCATTTACGATGATAATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGCGTGCAGAAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTTGGGGTATGAG GGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 72	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 73	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS INPSGNFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10452</b>		
SEQ ID NO: 74 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 75 (Kabat)	HCDR2	NTSPIGYTYAGSVKG
SEQ ID NO: 76 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 77 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL A
SEQ ID NO: 78 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 79 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 80 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 81 (Chothia)	HCDR2	SPIGY
SEQ ID NO: 82 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 83 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 84 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 85 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT

SEQ ID NO: 86	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYCCQQYSSFPFTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 87	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSN TSPIGYTYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 88	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGTGCCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCGTTTGTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTAATGCCAGCAGTATCTTCTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACG AAAGTTGAAATAAA
SEQ ID NO: 89	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATACT TCTCCTATTGGTTATACTTATATGCTGGTCTGTAAAGGTCGTTTTACC ATTTACCGTGATAATTCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTG CGTGGGAAGATACGGCCGTGATTAATGCGCGCGTTGGGGTGATGAGGGT TTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 90	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYCCQQYSSFPFTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEA
SEQ ID NO: 91	Тяжелая цепь (только домены VH и CH1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSN TSPIGYTYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD EGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKS
<b>MOR10701</b>		
SEQ ID NO: 92 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRSTIYPDSVKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 95 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL

SEQ ID NO: 96 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 97 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 98 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 99 (Chothia)	HCDR2	GAVGRS
SEQ ID NO: 100 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 101 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 102 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 103 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 104	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 105	VH	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV TGAVGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 106	DHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGGAC AGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGAAATCAAG

SEQ ID NO: 107	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACA GGCGCCGTGGGCAGAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 108	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 109	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV TGAVGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10702</b>		
SEQ ID NO: 110 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 111 (Kabat)	HCDR2	VISAWGHVKYYADSVKG
SEQ ID NO: 112 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 113 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 114 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 115 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 116 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 117 (Chothia)	HCDR2	SAWGHV

SEQ ID NO: 118 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 119 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 120 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 121 (Chothia)	LCDR3	YSSEFT
SEQ ID NO: 122	VL	DIQMTQSFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 123	VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 124	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCACAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 125	ДНК VH	GAGGTGCAATGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGCTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATC AGCGCCTGGGGCCACGTGAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 126	Легкая цепь каппа	DIQMTQSFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНКLQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC



SEQ ID NO: 127	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSV ISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYIT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD S DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b>		
SEQ ID NO: 128 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 129 (Kabat)	HCDR2	AINSQGKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 130 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 131 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL A
SEQ ID NO: 132 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 133 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 134 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 135 (Chothia)	HCDR2	NSQGKS
SEQ ID NO: 136 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 137 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 138 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 139 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT

SEQ ID NO: 140	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 141	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQKGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 142	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGGCAGC AGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 143	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAGCGGGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC AACAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACTGCAGATGAACAGC CTGCCGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCAGCAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 144	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV ДНKLQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 145	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA INSQKGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWG DEGFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI <sup>S</sup> SRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>S</sup> SKAKGQPREPQVY <sup>T</sup> LP <sup>S</sup> PREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD <sup>S</sup> DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <sup>F</sup> SCVMHEALHNNHYTQKSL <sup>S</sup> LS <sup>S</sup> PGK
<b>MOR10703</b> <b>N52S</b>		
SEQ ID NO: 146 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 147 (Kabat)	HCDR2	AI <u>S</u> SQKGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 148 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 149 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 150 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 151 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 152 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 153 (Chothia)	HCDR2	<u>S</u> SQGKS
SEQ ID NO: 154 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 155 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 156 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 157 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 158	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 159	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI <u>S</u> SQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVSS
SEQ ID NO: 160	DHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG

SEQ ID NO: 161	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC AGCAGCCAGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 162	Леткая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG SSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQGT KVEIKRVTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 163	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI SSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTIVTSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTRKQVSI.TCLVKGFPYSDTAVFWEF.SNGQPENNYKTTTPPVL.DSDGSFFL.YS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b> <b>N52G</b>		
SEQ ID NO: 164 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 165 (Kabat)	HCDR2	AIGSQGKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 166 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 167 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 168 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 169 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 170 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY

SEQ ID NO: 171 (Chothia)	HCDR2	<u>GS</u> QGKS
SEQ ID NO: 172 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 173 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 174 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 175 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 176	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 177	VH	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI <u>GS</u> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 178	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAGCAGCCTGAGGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCCAGCGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 179	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCGCCCATC GGCAGCCAGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGCCACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 180	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 181	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI <b>G</b> SQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b> <b>N52s_s52aN</b>		
SEQ ID NO: 182 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 183 (Kabat)	HCDR2	AI <b>SN</b> QGKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 184 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 185 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 186 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 187 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 188 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 189 (Chothia)	HCDR2	<b>SN</b> QGKS
SEQ ID NO: 190 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 191 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 192 (Chothia)	LCDR2	GAS

SEQ ID NO: 193 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 194	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 195	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI <b>SN</b> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 196	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGAAATCAAG
SEQ ID NO: 197	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCCGCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC AGCAACCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACCCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCAGCAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 198	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 199	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI <b>SN</b> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b> <b>A50V_N52S</b>		
SEQ ID NO: 200 (Kabat)	HCDR1	SYAMS

SEQ ID NO: 201 (Kabat)	HCDR2	<u>V</u> ISQ GKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 202 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 203 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 204 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 205 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 206 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 207 (Chothia)	HCDR2	<u>S</u> SQ GK S
SEQ ID NO: 208 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 209 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 210 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 211 (Chothia)	LCDR3	YSSFPTT
SEQ ID NO: 212	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 213	VH	EVQLLES GGLVQP GGS LRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS <u>V</u> <u>S</u> SQ GKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGT LTVVSS



SEQ ID NO: 214	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTCCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGAAATCAAG
SEQ ID NO: 215	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTATC AGCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCAGCAGG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 216	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQYSSFPSTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 217	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVI SSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICARWGDE GFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b> <b>A50V_N52G</b>		
SEQ ID NO: 218 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 219 (Kabat)	HCDR2	<b>VI</b> SSQGKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 220 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 221 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 222 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS

SEQ ID NO: 223 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 224 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 225 (Chothia)	HCDR2	<u>GS</u> QGKS
SEQ ID NO: 226 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 227 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 228 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 229 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 230	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 231	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS <u>VI</u> <u>GS</u> QGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGD GFDIWGQGLTVSS
SEQ ID NO: 232	DHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCAGCGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGAAATCAAG
SEQ ID NO: 233	DHK VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCC'TGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTCATC GGCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCAGCAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCC'TGGTCACCGTCAGTCA

SEQ ID NO: 234	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPFTTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 235	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS <u>VI</u> <u>GS</u> QGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10703</b> <b>s52aA</b>		
SEQ ID NO: 236 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 237 (Kabat)	HCDR2	AIN <u>A</u> QGKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 238 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 239 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 240 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 241 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPFT
SEQ ID NO: 242 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 243 (Chothia)	HCDR2	<u>NA</u> QGKS
SEQ ID NO: 244 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 245 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW

SEQ ID NO: 246 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 247 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 248	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTITSSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 249	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI NAQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVVSS
SEQ ID NO: 250	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCAGCGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 251	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC AACGCCAGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGCGCAGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 252	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTITSSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 253	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI NAQGGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<b>MOR10703</b> <b>S52aT</b>		
SEQ ID NO: 254 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 255 (Kabat)	HCDR2	AIN <u>T</u> Q GKSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 256 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 257 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL A
SEQ ID NO: 258 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 259 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 260 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 261 (Chothia)	HCDR2	N <u>T</u> Q GK S
SEQ ID NO: 262 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 263 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 264 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 265 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 266	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 267	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI N <u>T</u> Q GKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 268	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGGCAGCGCTCCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 269	ДНК VH	GAGGTGCAATGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTACAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC AACACCCAGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 270	Легкая цепь каппа	DIQMTQSFSSLSASVGDVITTCRASQGISNWLAWYQKFGKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 271	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAI N <u>T</u> QGKSTYYADSVKGRFTISRDNISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRRE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10701</b> <b>R55s</b>		
SEQ ID NO: 272 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 273 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>S</u> STYYPDSVKG
SEQ ID NO: 274 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 275 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 276 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS

SEQ ID NO: 277 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 278 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 279 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>SS</u>
SEQ ID NO: 280 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 281 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 282 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 283 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 284	VL	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKFGKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 285	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVG <u>SS</u> TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 286	ДHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTGCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 287	ДHK VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTCACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACA GGCGCGTGGGCAGCAGCACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCAGCAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 288	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPSTTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVДHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 289	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVG <u>SS</u> STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTRKQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10701</b> <b>R55G</b>		
SEQ ID NO: 290 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 291 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>GS</u> STYYPDSVKG
SEQ ID NO: 292 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 293 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 294 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 295 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 296 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 297 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>GS</u>
SEQ ID NO: 298 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 299 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW



SEQ ID NO: 300 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 301 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 302	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 303	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVT GAVGGSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 304	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGGCAG AGAGTGACCATCACCTGTGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCTAAGCAGATTAGCGGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 305	ДНК VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGCAGGAGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTACAGCAGTACGCCATG AGCTGGGTCCGCGAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACA GGCGCCGTGGCGGAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACTTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCAGCAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 306	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTTFGQGT KVEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 307	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVT GAVGGSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTRKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

MOR10701 R55K		
SEQ ID NO: 308 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 309 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>K</u> STYYPDSVKG
SEQ ID NO: 310 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 311 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID NO: 312 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 313 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 314 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 315 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>K</u> S
SEQ ID NO: 316 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 317 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 318 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 319 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 320	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 321	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVG <u>K</u> STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 322	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGTTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGGCGTCCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 323	ДНК VH	GAGGTGCAATGCTGAAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCCTCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACA GGCGCCGTGGCAAAGCACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACTCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTCCAGATGGGGCGACGAG GGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 324	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFTTFFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 325	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVGKSTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTRNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>MOR10701</b> <b>делеция S56</b>		
SEQ ID NO: 326 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 327 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRITYYPDSVKG
SEQ ID NO: 328 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 329 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 330 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS

SEQ ID NO: 331 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 332 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 333 (Chothia)	HCDR2	GAVGRT
SEQ ID NO: 334 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 335 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 336 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 337 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 338	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 339	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVGRTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARWGDEG FDIWGQGLLTVSS
SEQ ID NO: 340	DHK VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGGCAG AGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCC AGCTCCCTGCAGAGCGCGTGCCTAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 341	DHK VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAGCGGCGGAGGCCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGC CTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACA GGCGCCGTGGGCAGAACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGC TTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 342	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPSTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 343	IgG1 тяжелой цепи	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVT GAVGRITYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEG FDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVKPKCDKTHCTCPPELLEGGPSVFLEPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
<b>MOR12609</b>		
SEQ ID NO: 344 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 345 (Kabat)	HCDR2	VINGLGYYTFYADSVKG
SEQ ID NO: 346 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 347 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 348 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 349 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 350 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 351 (Chothia)	HCDR2	NGLGYT
SEQ ID NO: 352 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 353 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW

SEQ ID NO: 354 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 355 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 356	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 357	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVI NGLGYTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVVSS
SEQ ID NO: 358	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGTGCCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCCCCTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTATTGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACG AAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 359	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCTGGTCAACCGGCGGCGAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTAT AATGGTCTTGGTTATACTACTTTTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCTGTTT ACCATTTACGTAATAATCGAAAAACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGCGTGCAGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTTGGGGTGTAGG GGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTACGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 360	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 361	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVI NGLGYTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDE GFDIWGQGLTVVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPEPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<b>MOR12610</b>		
SEQ ID NO: 362 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 363 (Kabat)	HCDR2	GTGPYGGTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 364 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 365 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
SEQ ID NO: 366 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
SEQ ID NO: 367 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
SEQ ID NO: 368 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 369 (Chothia)	HCDR2	GPYGG
SEQ ID NO: 370 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
SEQ ID NO: 371 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
SEQ ID NO: 372 (Chothia)	LCDR2	GAS
SEQ ID NO: 373 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
SEQ ID NO: 374	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGAS SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 375	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSGT GPYGGTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEG FDIWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 376	ДНК VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGAT CGTGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAGCACCGAAACTATTAATTTATGGTGGCT TCTTCTTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTCAGCGCTCTGGATCCGGC ACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT TATTATTGCCAGCAGTATTCTTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACG AAAGTTGAAATAAA
SEQ ID NO: 377	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTGCACCGGGCGGACG CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCCTCCGGATTACCTTAGCAGTATGCGATG AGCTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTA GGTCTTATGGTGGTACTTATATCTGATTCTGTTAAGGGTCTGTTTACC ATTTACGCTGATAATTCGAAAACACCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG CGTGCAGGAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTTGGGGTATGAGGGT TTTGATATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGCAGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 378	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGA SSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQYSSFPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDHK LQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 379	IgG1 тяжелой цепи	QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSGT GPYGGTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEG FDIWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKLSLSLSPGK

Другие антитела по изобретению включают антитела, где в аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, внесены мутации, но которые все еще обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичностью с последовательностями, описанными в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот внесены мутации в переменных областях по сравнению с переменными областями, представленными в последовательностях, описанных в табл. 1, тем не менее с сохранением по существу той же терапевтической активности.

Поскольку каждое из этих антител или их фрагментов может связываться с HER3, последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) можно "смешивать и подбирать" с получением других связывающих HER3 антител по изобретению. Такие "смешанные и подобранные" связывающие HER3 антитела можно исследовать с использованием анализов связывания, известных в данной области (например, ELISA и другие анализы, описанные в разделе "Примеры"). Когда эти цепи смешивают и подбирают, последовательность VH из конкретной пары VH/VL должна быть заменена структурно сходной последовательностью VH. Аналогично, полноразмерная последовательность тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь должна быть заменена структурно сходной полноразмерной последовательностью тяжелой цепи. Аналогично, последовательность VL из конкретной пары VH/VL должна быть заменена структурно сходной последовательностью VL. Аналогично, полноразмерная последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь должна быть заменена структурно сходной полноразмерной последовательностью легкой цепи. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его фрагменту, имеющим: переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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 переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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; где антитело специфично связывается с HER3 (например, человека и/или яванского макака).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающим HER3 антителам, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, как описано 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 CDR3 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.

области CDR обозначены с использованием системы Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989), Nature, 342:877-883; и Al-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273, 927-948).

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2; CDR2 SEQ ID NO: 3; CDR3 SEQ ID NO: 4; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 SEQ ID NO: 6 и CDR3 SEQ ID NO: 7.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 20; CDR2 SEQ ID NO: 21; CDR3 SEQ ID NO: 22; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 23; CDR2 SEQ ID NO: 24 и CDR3 SEQ ID NO: 25.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 38; CDR2 SEQ ID NO: 39; CDR3 SEQ ID NO: 40; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41; CDR2 SEQ ID NO: 42 и CDR3 SEQ ID NO: 43.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 56; CDR2 SEQ ID NO: 57; CDR3 SEQ ID NO: 58; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 59; CDR2 SEQ ID NO: 60 и CDR3 SEQ ID NO: 61.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 74; CDR2 SEQ ID NO: 75; CDR3 SEQ ID NO: 76; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 77; CDR2 SEQ ID NO: 78 и CDR3 SEQ ID NO: 79.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 92; CDR2 SEQ ID NO: 93; CDR3 SEQ ID NO: 94; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 95; CDR2 SEQ ID NO: 96 и CDR3 SEQ ID NO: 97.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 110; CDR2 SEQ ID NO: 111; CDR3 SEQ ID NO: 112; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 113; CDR2 SEQ ID NO: 114 и CDR3 SEQ ID NO: 115.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 128; CDR2 SEQ ID NO: 129; CDR3 SEQ ID NO: 130; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131; CDR2 SEQ ID NO: 132 и CDR3 SEQ ID NO: 133.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 146; CDR2 SEQ ID NO: 147; CDR3 SEQ ID NO: 148; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 149; CDR2 SEQ ID NO: 150 и CDR3 SEQ ID NO: 151.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 164; CDR2 SEQ ID NO: 165; CDR3 SEQ ID NO: 166; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 167; CDR2 SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 169.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 182; CDR2 SEQ ID NO: 183; CDR3 SEQ ID NO: 184; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 185; CDR2 SEQ ID NO: 186 и CDR3 SEQ ID NO: 187.

В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 200; CDR2 SEQ ID NO: 201; CDR3 SEQ ID NO: 202; CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 203; CDR2 SEQ ID NO: 204 и CDR3



В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит VH SEQ ID NO: 357 и VL SEQ ID NO: 356. В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с HER3, содержит VH SEQ ID NO: 375 и VL SEQ ID NO: 374. В одном варианте осуществления антитела против HER3 представляют собой антитела-антагонисты. В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с HER3, представляет собой антитело, которое описано в табл. 1.

Как используют в рамках изобретения, антитело человека содержит переменные области тяжелой или легкой цепи или полноразмерную тяжелую или легкую цепи, которые являются "продуктом" или "образованы из" конкретной последовательности эмбрионального типа, если переменные области или полноразмерные цепи антитела получены из системы, в которой используются гены иммуноглобулинов эмбрионального типа человека. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, имеющей гены иммуноглобулинов человека, представляющим интерес антигеном, или скрининг библиотеки генов иммуноглобулинов человека, экспонированных на фаге, с помощью представляющего интерес антигена. Антитело человека, которое является "продуктом" или "происходит из" последовательности иммуноглобулина эмбрионального типа человека, можно идентифицировать по существу путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов эмбрионального типа человека и выбора последовательности иммуноглобулина эмбрионального типа человека, которая является наиболее сходной по последовательности (т.е. наибольшая % идентичность) с последовательностью антитела человека. Антитело человека, которое является "продуктом" или "происходит из" конкретной последовательности иммуноглобулина эмбрионального типа человека, может содержать аминокислотные отличия по сравнению с последовательностью эмбрионального типа, вследствие, например, встречающихся в природе соматических мутаций или преднамеренного внесения сайт-направленных мутаций. Однако в каркасных областях VH или VL выбранное антитело человека, как правило, по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина эмбрионального типа человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело человека как являющееся человеческим, при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов эмбрионального типа других видов (например, последовательности эмбрионального типа мыши). В определенных случаях антитело человека может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, или по меньшей мере 95, или даже по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина эмбрионального типа. Как правило, рекомбинантное антитело человека проявляет не более 10 отличий в аминокислотах по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина эмбрионального типа человека в каркасных областях VH или VL. В определенных случаях антитело человека может проявлять не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина эмбрионального типа. Различные версии эмбрионального типа с использованием последовательностей VH и VL эмбрионального типа для репрезентативного набора антител против HER3 представлены в табл. 2 с использованием Kabat. Положения CDR выделены полужирным шрифтом. Примечания, используемые в таблицах для последовательностей эмбрионального типа, являются следующими: MOR10701-VH 3-07 означает петли CDR MOR10701 в каркасных областях последовательности VH эмбрионального типа 3-07 (номенклатура соответствует Vbase), MOR10703-VK L1 означает CDR из MOR10703 в каркасных областях эмбрионального типа из VK L1, где VK представляет собой легкую цепь каппа.

Различные версии эмбрионального типа ряда выбранных репрезентативных антител

НОМЕР SEQ ID	Название последовательности	Аминокислотная последовательность
	<b>VH-домен MOR10701</b>	
SEQ ID NO: 380	MOR10701-VH_3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVA <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 381	MOR10701-VH_3-09	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 382	MOR10701-VH_3-11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWIRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 383	MOR10701-VH_3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQATG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAGDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 384	MOR10701-VH_3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVG <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDDSNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCT <b>TWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 385	MOR10701-VH_3-20	EVQLVESGGGVVPPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALYHCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 386	MOR10701-VH_3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 387	MOR10701-VH_3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 388	MOR10701-VH_3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVA <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 389	MOR10701-VH_3-30.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVA <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 390	MOR10701-VH_3-30.5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWVA <b>VTGAVGRSTIYPDSVKGR</b> FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI

SEQ ID NO: 391	MOR10701-VH_3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVA <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 392	MOR10701-VH_3-43	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN SKNSLYLQMN SLRTEDTALYYCAK <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 393	MOR10701-VH_3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN AKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 394	MOR10701-VH_3-49	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFS <b>SYAMS</b> WFRQAPG KGLEWVG <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISR DGSKSIAYLQMN SLKTEDTAVYYCTR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 395	MOR10701-VH_3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 396	MOR10701-VH_3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEYVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN SKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 397	MOR10701-VH_3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 398	MOR10701-VH_3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVG <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISR DSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 399	MOR10701-VH_3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQASG KGLEWVG <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISR DSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYCTR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 400	MOR10701-VH_3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLVWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISR DN AKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 401	MOR10701-VH_3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>VTGAVGRSTYYPDSVKGR</b> FTISR DN SKNTLHLQMN SLRAEDTAVYYCKK <b>WGDEGF</b> DI
	<b>VH-домен MOR10703</b>	
SEQ ID NO: 402	MOR10703-VH_3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVA <b>AINSQGKSTYYADSVKGR</b> FTISR DN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 403	MOR10703-VH_3-09	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFS <b>SYAMS</b> WVRQAPG KGLEWVS <b>AINSQGKSTYYADSVKGR</b> FTISR DN AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAK <b>WGDEGF</b> DI

SEQ ID NO: 404	MOR10703-VH_3-11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 405	MOR10703-VH_3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQATG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> ENAKNSLYLQMN SLRAGDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 406	MOR10703-VH_3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>GAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCT <b>TWDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 407	MOR10703-VH_3-20	EVQLVESGGGVVPRGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNAKNSLYLQMN SLRAEDTALYHCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 408	MOR10703-VH_3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 409	MOR10703-VH_3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 410	MOR10703-VH_3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>AAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 411	MOR10703-VH_3-30.3	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>AAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 412	MOR10703-VH_3-30.5	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>AAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 413	MOR10703-VH_3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>AAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 414	MOR10703-VH_3-43	EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNSKNSLYLQMN SLRTEDTALYYCA <b>KWGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 415	MOR10703-VH_3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <b>SYAM</b> SWVRQAPG KGLEWV <b>SAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCAR <b>WGDEGF</b> DI
SEQ ID NO: 416	MOR10703-VH_3-49	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCTASGFTFS <b>SYAM</b> SWFRQAPG KGLEWV <b>GAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISR</b> DGSKSIAYLQMN SLKTEDTAVYYCT <b>RWDEGF</b> DI

SEQ ID NO: 417	MOR10703-VH_3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGDEGFDI
SEQ ID NO: 418	MOR10703-VH_3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEVYVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCARWGDEGFDI
SEQ ID NO: 419	MOR10703-VH_3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGDEGFDI
SEQ ID NO: 420	MOR10703-VH_3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARWGDEGFDI
SEQ ID NO: 421	MOR10703-VH_3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQASG KGLEWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYCTRWGDEGFDI
SEQ ID NO: 422	MOR10703-VH_3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLVWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGDEGFDI
SEQ ID NO: 423	MOR10703-VH_3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAINSQGGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMN SLRAEDTAVYYCKKWGDEGFDI
	<b>VK-домен MOR10701</b>	
SEQ ID NO: 424	MOR10701-VKI_O12 (то же, что и MOR10701 wt)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 425	MOR10701-VKI_O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 426	MOR10701-VKI_O18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 427	MOR10701-VKI_O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 428	MOR10701-VKI_A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK VPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVA TYYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 429	MOR10701-VKI_A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKRLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQYSSFPTT

SEQ ID NO: 430	MOR10701-VKI_L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQQKPGK VPKHLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 431	MOR10701-VKI_L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQQKPGK APKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 432	MOR10701-VKI_L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 433	MOR10701-VKI_L4	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 434	MOR10701-VKI_L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 435	MOR10701-VKI_L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 436	MOR10701-VKI_L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 437	MOR10701-VKI_L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 438	MOR10701-VKI_L23	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPAK APKLFYIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 439	MOR10701-VKI_L9	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISCLQSEDA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 440	MOR10701-VKI_L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRASQGISNWLAWYQQKPGK APELLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISCLQSEDA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 441	MOR10701-VKI_L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 442	MOR10701-VKI_L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPDFA TYCQQYSSFPTT



	<b>VK-домен MOR10701</b>	
SEQ ID NO: 443	MOR10703-VKI_O12 (то же, что и MOR10703 wt)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 444	MOR10703-VKI_O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 445	MOR10703-VKI_O18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTTISSLQPEDIA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 446	MOR10703-VKI_O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTTISSLQPEDIA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 447	MOR10703-VKI_A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK VPKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 448	MOR10703-VKI_A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKRLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 449	MOR10703-VKI_L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGK VPKHLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 450	MOR10703-VKI_L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGK APKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 451	MOR10703-VKI_L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 452	MOR10703-VKI_L4	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 453	MOR10703-VKI_L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 454	MOR10703-VKI_L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT
SEQ ID NO: 455	MOR10703-VKI_L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSFPTT

SEQ ID NO: 456	MOR10703-VKI_L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYCQYSSFPTT
SEQ ID NO: 457	MOR10703-VKI_L23	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPAK APKLFIIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQPEDFA TYCQYSSFPTT
SEQ ID NO: 458	MOR10703-VKI_L9	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQSEDFA TYCQYSSFPTT
SEQ ID NO: 459	MOR10703-VKI_L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRASQGISNWLAWYQQKPGK APELLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQSEDFA TYCQYSSFPTT
SEQ ID NO: 460	MOR10703-VKI_L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYCQYSSFPTT
SEQ ID NO: 461	MOR10703-VKI_L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFA TYCQYSSFPTT

Таблица 3

## Сегменты JH

SEQ ID NO: 462	JH1	WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 463	JH2	WGRGLVTVSS
SEQ ID NO: 464	JH3	WGQGMVTVSS
SEQ ID NO: 465	JH4	WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 466	JH5	WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 467	JH6	WGQGTVTVSS

Таблица 4

## Сегменты JK

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 VH эмбрионального типа с сегментами JH. Репрезентативные примеры комбинаций представлены в табл. 5.

Таблица 5

## Репрезентативные примеры комбинаций последовательностей VH эмбрионального типа с сегментами JH

SEQ ID NO: 473	MOR10701- VH_3-15_JH1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVGVTGAVGRSTIYPDSVKGREFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKT EDTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 474	MOR10701- VH_3-15_JH3	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVGVTGAVGRSTIYPDSVKGREFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKT EDTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGMVTVSS
SEQ ID NO: 475	MOR10703- VH_3-15_JH1	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVGAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKT EDTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 476	MOR10703- VH_3-15_JH3	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVGAINSQGKSTIYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKT EDTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGMVTVSS

Можно использовать любую комбинацию последовательностей VL эмбрионального типа с сегментами JK. Репрезентативные примеры комбинаций представлены в табл. 6.

Таблица 6

Репрезентативные примеры комбинаций последовательностей VK эмбрионального типа с сегментами JK

SEQ ID NO: 477	MOR10701- VKI_O2_JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGAP KLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSSFPTTFGGQTKVEIK
SEQ ID NO: 478	MOR10701- VKI_O2_JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGAP KLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSSFPTTFGGGQTKVEIK
SEQ ID NO: 479	MOR10703- VKI_A20_JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGVP KLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC QQYSSFPTTFGGGQTKVEIK
SEQ ID NO: 480	MOR10703- VKI_A20_JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGVP KLLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC QQYSSFPTTFGGQTKVEIK

После комбинирования VH с JH и VK с JK, можно использовать любую комбинацию VH или JH с VK или JK. В одном варианте осуществления, любую из областей VH эмбрионального типа можно комбинировать с любой из областей VK (VL) эмбрионального типа для каждого антигена. Репрезентативный набор примеров комбинаций представлен в табл. 7.

Таблица 7

Репрезентативные примеры комбинаций последовательностей эмбрионального типа

	Комбинация 1	
SEQ ID NO: 481	MOR10701-VH_3- 15_JH3	EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVGVGAVGRSTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSL KTEDTAVYYCTTWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO: 482	MOR10701- VKI_A30_JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGHA PKRLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTEFTLTISLQPEDFATY YQQYSSFPTTFGGGQTKVEIK
	Комбинация 2	
SEQ ID NO: 483	MOR10701-VH_3- 30_JH1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSLCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVAVTGAVGRSTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCAKRWDEGFDIWRGGLVTVTVSS
SEQ ID NO: 484	MOR10701- VKI_L1_JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGHA PKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YQQYSSFPTTFGGQTKLEIK
	Комбинация 3	
SEQ ID NO: 485	MOR10701-VH_3- 30_JH2	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSLCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVAVTGAVGRSTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCAKRWDEGFDIWRGGLVTVTVSS
SEQ ID NO: 486	MOR10701- VKI_L1_JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPKGHA PKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YQQYSSFPTTFGGQTKLEIK
	Комбинация 4	
SEQ ID NO: 487	MOR10703-VH_3- 20_JH5	EVQLVESGGGVVVRPGLSLRSLCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVVAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTALYHCARWDEGFDIWRGGLVTVTVSS
SEQ ID NO: 488	MOR10703- VKI_L15_JK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKA PKSLIYGASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YQQYSSFPTTFGGPGTKVDIK
	Комбинация 5	
SEQ ID NO: 489	MOR10703-VH_3- 33_JH2	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSLCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCARWDEGFDIWRGGLVTVTVSS

SEQ ID NO: 490	MOR10703- VKI_A20_JK1	DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKV PKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATY YCCQYSSFPPTTFGGGTKVEIK
<b>Комбинация 6</b>		
SEQ ID NO: 491	MOR10703-VH_3- 33_JH3	QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVROAPGK GLEWVAAINSQQGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO: 492	MOR10703- VKI_A20_JK2	DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKV PKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATY YCCQYSSFPPTTFGGGTKLEIK

В одном варианте осуществления изобретение относится к вариательной области тяжелой цепи, содержащей последовательность Хаа<sub>1</sub>-HCDR1-Хаа<sub>2</sub>-HCDR2-Хаа<sub>3</sub>-HCDR3-Хаа<sub>4</sub>, где HCDR1, HCDR2, HCDR3 тяжелой цепи представляют собой любые CDR тяжелой цепи, выбранные из табл. 1 и 2. Только для иллюстративных целей последовательность может представлять собой:

Хаа<sub>1</sub>-SYAMS-Хаа<sub>2</sub>-AINSQQGKSTYYADSVKG-Хаа<sub>3</sub>-WGDEGFDI-Хаа<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 493),

где Хаа<sub>1</sub> представляет собой каркасную область из любых 30 аминокислот;

Хаа<sub>2</sub> представляет собой каркасную область из любых 14 аминокислот;

Хаа<sub>3</sub> представляет собой каркасную область из любых 32 аминокислот;

Хаа<sub>4</sub> представляет собой каркасную область из любых 11 аминокислот.

В одном варианте осуществления изобретение относится к вариательной области легкой цепи, содержащей последовательность

Хаа<sub>1</sub>-LCDR1-Хаа<sub>2</sub>-LCDR2-Хаа<sub>3</sub>-LCDR3-Хаа<sub>4</sub>,

где LCDR1, LCDR2, LCDR3 легкой цепи представляют собой любые CDR легкой цепи, выбранные из табл. 1 и 2.

Только для иллюстративных целей, последовательность может представлять собой:

Хаа<sub>1</sub>-RASQGISNWLAW-Хаа<sub>2</sub>-GASSLQSG-Хаа<sub>3</sub>-QQYSSFPPTT-Хаа<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 494),

где Хаа<sub>1</sub> представляет собой каркасную область из любых 23 аминокислот;

Хаа<sub>2</sub> представляет собой каркасную область из любых 15 аминокислот;

Хаа<sub>3</sub> представляет собой каркасную область из любых 32 аминокислот; и

Хаа<sub>4</sub> представляет собой каркасную область из любых 10 аминокислот.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут представлять собой производные одноцепочечных антител, диантител, доменных антител, наноантител и униантител. "Одноцепочечное антитело" (scFv) состоит из одной полипептидной цепи, содержащей VL-домен, связанный с VH-доменом, где VL-домен и VH-домен образуют пару, формируя одновалентную молекулу. Одноцепочечное антитело можно получать в соответствии со способом, известным в данной области (см., например, Bird et al., (1988), Science, 242:423-426 и Huston et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883). "Диантитело" состоит из двух цепей, причем каждая цепь содержит вариательную область тяжелой цепи, связанную с вариательной областью легкой цепи на той же полипептидной цепи, соединенных коротким пептидным линкером, где две области на одной цепи образуют пару не друг с другом, а с комплементарными доменами на другой цепи, формируя биспецифическую молекулу. Способы получения диантител известны в данной области (см., например, Holliger et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448, и Poljak et al., (1994), Structure, 2:1121-1123). Доменные антитела (dAb) представляют собой небольшие функциональные связывающие элементы антител, соответствующие вариательным областям либо тяжелых, либо легких цепей антител. Доменные антитела хорошо экспрессируются в клеточных системах бактерий, дрожжей и млекопитающих. Дальнейшие детали по доменным антителам и способам их получения известны в данной области (см., например, патенты США № 6291158; 6582915; 6593081; 6172197; 6696245; патенты Европы 0368684 и 0616640; WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609). Наноантитела происходят из тяжелых цепей антитела. Наноантитело, как правило, содержит один вариательный домен и два константных домена (CH2 и CH3) и сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Наноантитело можно получать способами, известными в данной области (см. например, патенты США № 6765087, 6838254, WO 06/079372). Униантитела состоят из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи IgG4-антитела. Униантитела можно получать путем удаления шарнирной области IgG4-антитела. Дальнейшие детали об униантителах и способах их получения могут быть найдены в WO 2007/059782.

Гомологичные антитела.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, содержащему аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, описанным в табл. 1, и указанное антитело связывается с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака) и сохраняет желательные функциональные свойства антител, описанных в табл. 1.

Например, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу (или его функциональному фрагменту), содержащему вариательную область тяжелой цепи и вариательную область лег-

кой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из 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; вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из 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 HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака) и нейтрализует активность передачи сигнала HER3, которую можно определять в анализе фосфорилирования, или другой показатель передачи сигнала HER (например, анализы фосфо-HER3, анализы фосфо-Akt, анализы клеточной пролиферации и анализы блокирования лиганда, как описано в примерах). Также в объем изобретения включены исходные нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей; и полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепей, оптимизированные для экспрессии в клетке млекопитающего. Другие антитела по изобретению включают аминокислоты или нуклеиновые кислоты, в которые внесены мутации, но которые обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью с последовательностями, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот подвергнуто мутации путем делеции, инсерции или замены аминокислот в вариабельных областях по сравнению с вариабельными областями, представленными в последовательности, описанной выше.

В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным в табл. 1. В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичными, за исключением аминокислотной замены не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 положениях аминокислот. Антитело, имеющее области VH и VL, обладающие высокой (т.е. 80% или более) идентичностью с областями VH и VL антител, описанных в табл. 1, можно получать с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредуемого ПЦР мутагенеза) с последующим исследованием кодируемого измененного антитела в отношении сохраненной функции с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

В других вариантах осуществления вариабельные области нуклеотидных последовательностей тяжелой цепи и/или легкой цепи могут быть на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным выше.

Как используют в рамках изобретения, "процентная идентичность" между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, являющихся общими для последовательностей (т.е. % идентичность равна: количество идентичных положений/общее количество положений  $\times$  100), учитывая количество пропусков и длину каждого пропуска, который необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями можно проводить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Дополнительно или альтернативно, последовательности белков по настоящему изобретению можно далее использовать в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска против общественных баз данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Например, такой поиск можно проводить с использованием программы BLAST (версия 2.0) Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10.

Антитела с консервативными модификациями.

В определенных вариантах осуществления антитело по изобретению имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из этих последовательностей CDR обладают определенными аминокислотными последовательностями, исходя из антител, описанных в настоящем документе, или их консервативными модификациями, и где антитела сохраняют желательные функциональные свойства связывающих HER3 антител по изобретению.

Таким образом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против HER3 или его фрагменту, состоящим из вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где аминокислотные последовательности CDR1 вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из 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 консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из 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 консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из

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 консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR1 варибельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из 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 консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 варибельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из 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 консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 варибельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из 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 консервативных модификаций; антитело или его фрагмент специфично связывается с HER3 и нейтрализует активность HER3 путем ингибирования каскада передачи сигнала HER, которое можно измерять в анализе фосфорилирования, или посредством другого показателя передачи сигнала HER (например, анализы фосфо-HER3, анализы фосфо-Akt, анализы клеточной пролиферации и анализы блокирования лиганда, как описано в примерах).

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые взаимодействуют (например, путем связывания, пространственного препятствования, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с тем же эпитопом, что и связывающие HER3 антитела, описанные в табл. 1 и на фиг. 7. Дополнительные антитела, таким образом, можно идентифицировать, исходя из их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание на статистически значимом уровне) с другими антителами по изобретению в анализах связывания HER3. Способность исследуемого антитела ингибировать связывание антител по настоящему изобретению с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака) демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с этим антителом за связывание с HER3; такое антитело может, согласно неограничивающей теории, связываться с тем же или родственным (например, структурно сходным или пространственно близким) эпитопом на белке HER3, с которым связывается антитело, с которым оно конкурирует. В определенном варианте осуществления антитело, которое связывается с тем же эпитопом на HER3, что и антитела по настоящему изобретению, представляет собой моноклональное антитело человека. Такие моноклональные антитела человека можно получать и выделять, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагменты связываются как с доменом 2, так и с доменом 4, HER3, удерживая HER3 в неактивной конформации, которая препятствует раскрытию 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 лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала HER3.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связываются как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3 без блокирования одновременного связывания лиганда HER3, такого как нейрорегулин. Хотя предоставление теории не требуется, возможно, что антитело или его фрагмент, связывающиеся как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, удерживают HER3 в неактивной конформации без блокирования участка связывания лиганда на HER3. Таким образом, лиганд HER3 (например, нейрорегулин) способен связываться с HER3 одновременно с антителом или его фрагментом.

Антитела по изобретению или их фрагменты ингибируют как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую активацию HER3 без препятствования связыванию лиганда. Это считается преимуществом по следующим причинам.

(i) Терапевтическое антитело может иметь клиническую применимость при широком спектре опухолей по сравнению с антителом, которое нацелено на один механизм активации HER3 (т.е. лиганд-зависимый или лиганд-независимый), поскольку каждый механизм запускает различные типы опухолей.

(ii) Терапевтическое антитело может быть эффективным в типах опухолей, в которые одновременно вовлечены оба механизма активации HER3. Антитело, нацеленное на один механизм активации HER3 (т.е. лиганд-зависимый или лиганд-независимый), будет проявлять небольшую эффективность или отсутствие эффективности в этих типах опухолей.

(iii) На эффективность антитела, которое ингибирует лиганд-зависимую активацию HER3 без препятствования связыванию лиганда, менее вероятно будет оказывать отрицательное влияние увеличение концентрации лиганда. Это приведет либо к увеличенной эффективности в типе опухоли, запускаемом очень высокой концентрацией лиганда HER3, либо к сниженной склонности к устойчивости к лекарственному средству, где устойчивость опосредуется активацией лигандов HER3.

(iv) Антитело, которое ингибирует активацию HER3 путем стабилизации неактивной формы, будет менее склонным к устойчивости к лекарственному средству, запускаемой альтернативными механизмами активации HER3.

Следовательно, антитела по изобретению можно использовать для лечения состояний, при которых существующие терапевтические антитела являются клинически неэффективными.

Полученные способами инженерии и модифицированные антитела.

Кроме того, антитело по изобретению можно получать с использованием антитела, имеющего одну или несколько последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, в качестве исходного материала для конструирования способами инженерии модифицированного антитела, которое может иметь измененные свойства относительно исходного антитела. Антитело можно конструировать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. VH и/или VL), например в одной или нескольких областях CDR и/или в одной или нескольких каркасных областях. Дополнительно или альтернативно, антитело можно конструировать путем модификации остатков в константной области(ях), например, для изменения эффекторной функции(ий) антитела.

Одним из типов конструирования способами инженерии переменной области, который можно проводить, является пересадка CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями в основном через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарности областях (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR являются более разнообразными между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных встречающихся в природе антител, путем конструирования экспрессирующих векторов, которые включают последовательности CDR из конкретного встречающегося в природе антитела, пересаженного в каркасные последовательности из другого антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann et al., (1998), *Nature*, 332:323-327; Jones et al., (1986), *Nature*, 321:522-525; Queen et al., (1989), *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

Таким образом, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному связывающему HER3 моноклональному антителу или его фрагменту, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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; и переменную область легкой цепи, обладающую последовательностями CDR1, имеющими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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; последовательностями CDR2, имеющими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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 последовательностями CDR3, состоящими из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из 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, такие антитела содержат последовательности CDR VH и VL моноклональных антител, но тем не менее могут содержать отличающиеся каркасные последовательности от этих антител. Такие каркасные последовательности можно получать из общественных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител эмбрионального типа. Например, последовательности ДНК эмбрионального типа для генов переменной области тяжелой и легкой цепей человека могут быть найдены в базе данных последовательностей эмбрионального типа человека "Vase" (доступной через интернет на [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), а также в Kabat et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987), *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., (1989), *Nature*, 342:877-883; и Al-Lazikani et al., (1997), *J. Mol. Biol.* 273:927-948; Tomlinson et al., (1992), *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox et al., (1994), *Eur. J Immunol.* 24:827-836; содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Примером каркасных последовательностей для применения в антителах по изобретению являются каркасные последовательности, которые структурно сходны с каркасными последовательностями, используемыми в выбранных антителах по изобретению, например консенсусные последовательности и/или каркасные последовательности, используемые в моноклональных антителах по изобретению. Последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL можно пересаживать в каркас-

ные области, которые имеют идентичную последовательность с последовательностью, встречающейся в гене иммуноглобулина эмбрионального типа, из которого происходят каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть пересажены в каркасные области, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями эмбрионального типа. Например, было открыто, что в определенных случаях является полезным внесение мутаций остатков в каркасных областях для поддержания или усиления способности антитела связывать антиген (см. например, патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al).

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в областях CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH и/или VL, чтобы тем самым улучшить одно или несколько связывающих свойств (например, аффинность) представляющего интерес антитела, известная как "созревание аффинности". Для внесения мутации(ий) можно проводить сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредуемый мутагенез, и эффект на связывание антитела или другое представляющее интерес свойство можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе и представлено в примерах. Можно вносить консервативные модификации (как рассмотрено выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, вставки или делеции. Более того, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в области CDR.

Таким образом, в другом варианте осуществления изобретение относится к выделенным связывающим HER3 моноклональным антителам или их фрагментам, состоящим из вариабельной области тяжелой цепи, имеющей: область CDR1 VH, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, имеющей 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 аминокислотной последовательности, имеющей одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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; область CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, 116, 237, 243, 255, 261, 273, 279, 291, 297, 309, 315, 327, 333, 345, 351, 363 и 369, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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; область CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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; область CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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; область CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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 область CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 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, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок 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.

Пересадка фрагментов антител в альтернативные каркасные области или остовы.

Можно использовать широкое множество каркасных областей или остовов антител/иммуноглобулинов, при условии что полученный полипептид включает по меньшей мере одну связывающую область, которая специфично связывается с HER3. Такие каркасные области или остовы включают 5 основных типов иммуноглобулинов человека или их фрагментов, и включают иммуноглобулины других видов животных, предпочтительно имеющих гуманизированные аспекты. Специа-



листы в данной области продолжают открывать и разрабатывать новые каркасные области, остовы и фрагменты.

В одном аспекте изобретение относится к получению антител не на основе иммуноглобулинов с использованием неиммуноглобулиновых остовов, в которые можно трансплантировать CDR по изобретению. Могут быть использованы известные или открытые в будущем неиммуноглобулиновые каркасные области и остовы при условии, что они содержат связывающую область, специфичную к белку HER3-мишени (например, HER3 человека и/или яванского макака). Известные неиммуноглобулиновые каркасные области или остовы включают, но не ограничиваются ими, фибронектин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), анкирин (Molecular Partners AG, Zurich, Швейцария), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, and Ablynx nv, Zwijnaarde, Бельгия), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Германия), малые модульные иммунофармацевтические препараты (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), максантитела (Avidia, Inc., Mountain View, CA), белок А (Affibody AG, Швеция) и аффилин (гамма-крисТаллин или убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Halle, Германия).

Фибронектиновые остовы основаны на домене фибронектина типа III (например, десятый модуль фибронектина типа III ( $^{10}$ Fn3-домен)). Домен фибронектина типа III имеет 7 или 8 бета-цепей, которые распределены между двумя бета-слоями, которые сами по себе упаковываются друг с другом с образованием сердцевины белка, и, кроме того, содержат петли (аналогичные CDR), которые соединяют бета-цепи друг с другом и экспонированы для растворителя. Существует по меньшей мере три такие петли на каждом крае сэндвича из бета-слоев, где край представляет собой границу белка, перпендикулярную направлению бета-цепей (см. US 6818418). Эти остовы на основе фибронектина не являются иммуноглобулином, хотя общая укладка в высокой степени сходна с укладкой наименьшего функционального фрагмента антитела варибельной области тяжелой цепи, которая содержит весь антигенраспознающий элемент в IgG верблюда или ламы. Благодаря этой структуре неиммуноглобулиновое антитело имитирует свойства связывания антигена, которые сходны по природе и аффинности со свойствами антител. Эти остовы можно использовать в стратегии рандомизации петель и шаффлинга *in vitro*, которая сходна с процессом созревания аффинности антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина можно использовать в качестве остовов, где области петель молекулы могут быть заменены CDR по изобретению с использованием стандартных способов клонирования. Технология анкиринов основана на использовании белков с происходящими из анкирина повторяющимися модулями в качестве остовов для вмещения варибельных областей, которые можно использовать для связывания с различными мишенями. Модуль анкиринового повтора представляет собой полипептид из 33 аминокислот, состоящий из двух антипараллельных  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$  поворота. Связывание варибельных областей, главным образом, оптимизируют с использованием рибосомального дисплея.

Авимеры происходят из природного белка, содержащего А-домен, такого как HER3. Эти домены используют вследствие их природы белок-белковых взаимодействий, и у человека свыше 250 белков структурно основаны на А-доменах. Авимеры состоят из ряда различных мономеров "А-домена" (2-10), связанных аминокислотными линкерами. Авимеры, которые связываются с антигеном мишенью, можно создавать с использованием методики, описанной, например, в публикациях патентных заявок США № 20040175756; 20050053973; 20050048512 и 20060008844.

Аффинные лиганды аффител представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трех-спирального пучка на основе каркаса из одного из связывающих доменов IgG белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот домен остова состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизированы с получением библиотек аффитела с большим количеством вариантов лигандов (см., например, US 5831012). Молекулы аффител имитируют антитела, они имеют молекулярную массу 6 кДа по сравнению с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кДа. Несмотря на небольшой размер, участок связывания молекул аффител сходен с участком связывания антитела.

Антикалины представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris ProteoLab AG. Они происходят из липокалинов, широко распространенной группы небольших и прочных белков, которые обычно вовлечены в физиологический транспорт или хранение химически чувствительных или нерастворимых соединений. В тканях и жидкостях организма человека встречается несколько природных липокалинов. Архитектура белка напоминает иммуноглобулины с гиперварибельными петлями наверху жесткого каркаса. Однако в противоположность антителам и их рекомбинантным фрагментам липокалины состоят из одной полипептидной цепи с 160-180 аминокислотными остатками, которые только немного больше единичного иммуноглобулинового домена. Набор из четырех петель, которые образуют связывающий карман, демонстрирует выраженную структурную пластичность и допускает множество боковых цепей. Таким образом, форма участка связывания может быть изменена по собственной технологии для распознавания намеченных молекул-мишеней различной формы с высокой аффинностью и специфичностью. Один белок семейства липокалинов, билин-связывающий белок (BBP) от Pieris Brassicae, используют для разработки антикалинов путем мутагенеза набора из четырех петель. Одним из примеров патентной заявки, описывающей антикалины, является публикация РСТ № WO 1999/16873.

Молекулы аффилинов представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые предназначены для специфической аффинности к белкам и небольшим молекулам. Новые молекулы аффилинов можно очень быстро отбирать из двух библиотек, каждая из которых основана на отличающемся происходящем из человека белке остова. Молекулы аффилинов не показывают какой-либо структурной гомологии к белкам иммуноглобулинов. В настоящее время используют два остова аффилинов, один из которых представляет собой гамма-кристаллический структурный белок хрусталика глаза человека, а другой представляет собой белки суперсемейства "убиквитинов". Оба человеческих остова являются очень небольшими, демонстрируют высокую стабильность к температурам и практически устойчивы к изменениям pH и денатурирующим агентам. Эта высокая стабильность, главным образом, является следствием расширенной структуры бета-слоя этих белков. Примеры белков, происходящих из гамма-кристаллических белков, описаны в WO 200/104144, и примеры "убиквитин-подобных" белков описаны в WO 2004/106368.

Миметики эпитопов белков (PEM) представляют собой циклические подобные пептидам молекулы среднего размера (MM 1-2 кДа), имитирующие бета-шпильчатые вторичные структуры белков, основную вторичную структуру, вовлеченную в белок-белковые взаимодействия.

В некоторых вариантах осуществления Fab конвертируют в формат молчащих IgG1 путем замены Fc-области. Например, антитела в табл. 1 можно конвертировать в формат IgG.

Антитела человека или гуманизированные антитела.

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим антителам, которые специфично связываются с белком HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака/мыши/крысы). По сравнению с химерными или гуманизированными антителами связывающие HER3 антитела человека имеют дополнительно сниженную антигенность при введении человеку.

Связывающие HER3 антитела человека можно получать с использованием способов, которые известны в данной области. Например, для преобразования не являющихся человеческими антител в сконструированные антитела человека используют технологию Humanizing. В публикации патента США № 20050008625 описан способ *in vivo* для замены вариательной области не являющегося человеческим антитела вариательной областью человека в антителе при сохранении тех же или обеспечении лучших характеристик связывания относительно характеристик не являющегося человеческим антитела. Способ основан на определяемой эпитопом замене вариательных областей не являющегося человеческого эталонного антитела вариательными областями полностью человеческого антитела. Полученное антитело человека, как правило, не является структурно сходным с эталонным не являющимся человеческим антителом, но связывается с тем же эпитопом на том же антигене, что и эталонное антитело. В кратком изложении, подход последовательной определяемой эпитопом комплементарной замены обеспечивается созданием конкуренции в клетках между "конкурентом" и библиотекой разнообразных гибридов эталонного антитела ("исследуемые антитела") за связывание с ограниченными количествами антигена в присутствии репортерной системы, которая отвечает на связывание исследуемого антитела с антигеном. Конкурентом может быть эталонное антитело или его производное, такое как одноцепочечный Fv-фрагмент. Конкурентом также может быть природный или искусственный лиганд антигена, который связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело. Единственным требованием для конкурента является то, чтобы он связывался с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и чтобы он конкурировал с эталонным антителом за связывание антигена. Исследуемые антитела имеют одну общую связывающую антиген V-область из не являющегося человеческим эталонного антитела и другую V-область, выбранную случайным образом из разнообразного источника, такого как библиотека набора антител человека. Общая V-область из эталонного антитела служит в качестве ориентира, располагающего исследуемые антитела на одном и том же эпитопе на антигене и в той же ориентации, так чтобы предпочтительным был выбор наиболее высокого сходства в связывании антитела с эталонным антителом.

Для обнаружения желательных взаимодействий между исследуемыми антителами и антигеном можно использовать множество типов репортерных систем. Например, комплементирующие репортерные фрагменты можно связывать с антигеном и исследуемым антителом, соответственно, так чтобы активация репортера комплементацией фрагментов происходила только тогда, когда исследуемое антитело связывается с антигеном. Когда слитые конструкции исследуемое антитело-репортерный фрагмент и антиген-репортерный фрагмент коэкспрессируются с конкурентом, активация репортера становится зависимой от способности исследуемого антитела конкурировать с конкурентом, которая пропорциональна аффинности исследуемого антитела к антигену. Другие репортерные системы, которые можно использовать, включают систему реактиватора аутоингибируемой реактивации репортера (RAIR), как описано в патентной заявке США с серийным номером № 10/208730 (публикация № 20030198971), или систему конкурентной активации, описанную в патентной заявке США с серийным номером № 10/076845 (публикация № 20030157579).

В случае системы последовательной определяемой эпитопом комплементарной замены проводят отбор для идентификации клеточек, которые экспрессируют одно исследуемое антитело вместе с конкурентом, антигеном и репортерными компонентами. В этих клетках каждое исследуемое антитело индивидуально конкурирует за связывание с ограниченным количеством антигена. Активность репортера

пропорциональна количеству антигена, связанного и исследуемым антителом, которое, в свою очередь, пропорционально аффинности исследуемого антитела к антигену и стабильности исследуемого антитела. Исследуемые антитела первоначально отбирают на основании их активности относительно активности эталонного антитела, когда оно экспрессируется как и исследуемое антитело. Результатом первого раунда селекции является набор "гибридных" антител, каждое из которых состоит из одной и той же не являющейся человеческой V-области из эталонного антитела и V-области человека из библиотеки, и каждое из которых связывается с тем же эпитопом на антигене, что и эталонное антитело. Одно или несколько из отобранных в первом раунде гибридных антител имеют аффинность к антигену, сравнимую с или превышающую аффинность эталонного антитела.

На второй стадии замены V-областей V-области человека, отобранные на первой стадии, используют в качестве ориентира для отбора происходящих из человека замен для остальной V-области эталонного не являющегося человеческим антитела в разнообразной библиотеке когнатных V-областей человека. Гибридные антитела, отобранные в первом раунде, также можно использовать в качестве конкурентов для второго раунда селекции. Результатом второго раунда селекции является набор полностью человеческих антител, которые структурно отличаются от эталонного антитела, но которые конкурируют с эталонным антителом за связывание с тем же антигеном. Некоторые из отобранных антител человека связываются с тем же эпитопом на том же антигене, что и эталонное антитело. Среди этих отобранных антител человека одно или несколько связываются с тем же эпитопом с аффинностью, которая сравнима с или превышает аффинность эталонного антитела.

С использованием одного из связывающих HER3 антител мыши или химерных связывающих HER3 антител, описанных выше, в качестве эталонного антитела, этот способ можно полностью использовать для получения антител человека, которые связываются с HER3 человека с той же специфичностью связывания и с той же или лучшей аффинностью связывания. Кроме того, такие связывающие HER3 антитела человека также можно получать коммерчески от компаний, которые изготавливают антитела человека на заказ, например KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

Антитела животных семейства верблюжьих.

Белки антител, полученные от представителей семейства верблюдов и дромадеров (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включая представителей западного полушария, таких как виды ламы (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), охарактеризованы в отношении размера, структурной сложности и антигенности для человека. Определенные IgG-антитела этого семейства млекопитающих, встречающиеся в природе, лишены легких цепей и, таким образом, структурно отличаются от типичной четырехкомпонентной структуры из четырех цепей, имеющей две тяжелые и две легкие цепи, антител от других животных. См. PCT/EP93/02214 (WO 94/04678, опубликованную 3 марта 1994 г.).

Область антитела животного семейства верблюжьих, которая представляет собой небольшой единый вариабельный домен, идентифицированный как V<sub>H</sub>N, можно получать способами генетической инженерии с получением небольшого белка, имеющего высокую аффинность к мишени, что обеспечивает происходящий из низкомолекулярного антитела белок, известный как "наноантитело верблюда". См. патент США № 5759808, выданный 2 июня 1998 г.; также см. Stijlemans et al., (2004), *J. Biol. Chem.* 279:1256-1261; Dumoulin et al., (2003), *Nature*, 424:783-788; Pleschberger et al. (2003). *Bioconjugate Chem.* 14:440-448; Cortez-Retamozo et al. (2002), *Int. J. Cancer*, 89:456-62; и Lauwereys et al. (1998), *EMBO J.* 17:3512-3520. Сконструированные методами инженерии библиотеки антител животных семейства верблюжьих и фрагментов антител коммерчески доступны, например, от Ablynx, Ghent, Бельгия (например, US20060115470; Domantis (US20070065440, US20090148434). Как и в случае других антител, не происходящих от человека, аминокислотную последовательность антитела животного семейства верблюжьих можно изменять рекомбинантными способами для получения последовательности, которая в наибольшей степени напоминает последовательность человека, т.е. наноантитело можно "гуманизировать". Таким образом, можно далее снижать природную низкую антигенность антител животных семейства верблюжьих для человека.

Наноантитело животных семейства верблюжьих имеет молекулярную массу, приблизительно равную одной десятой молекулярной массы молекулы IgG человека, и белок имеет физический диаметр только несколько нанометров. Одним из следствий малого размера является способность наноантител животных семейства верблюжьих связываться с антигенными участками, которые являются функционально невидимыми для более крупных белков антител, т.е. наноантитела верблюда пригодны в качестве реагентов для обнаружения антигенов, которые в ином случае скрыты при использовании классических иммунологических способов, и в качестве возможных терапевтических средств. Таким образом, другое последствие малого размера состоит в том, что наноантитело верблюда может осуществлять ингибирование в результате связывания с конкретным участком в желобке или узкой щели белка-мишени и, таким образом, может действовать с функциональными возможностями, которые более напоминают функцию классических низкомолекулярных лекарственных средств, чем функцию классического антитела.

Кроме того, низкая молекулярная масса и компактный размер приводят к тому, что наноантитела животных семейства верблюжьих являются чрезвычайно термостабильными, стабильными к крайним значениям pH и к протеолитическому расщеплению и слабоантигенными. Другое следствие состоит в

том, что наноантитела животных семейства верблюжьих легко проходят из кровеносной системы в ткани и даже проходят через гематоэнцефалический барьер и могут лечить нарушения, которые поражают нервную ткань. Кроме того, наноантитела могут облегчать транспорт лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. См. патентную заявку США 20040161738, опубликованную 19 августа 2004 г. Эти признаки в комбинации с низкой антигенностью у человека указывают на значительный терапевтический потенциал. Кроме того, эти молекулы могут полностью экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как *E.coli*, и экспрессируются в качестве слитых белков с бактериофагом, и являются функциональными.

Таким образом, признаком настоящего изобретения является антитело или наноантитело животных семейства верблюжьих, имеющее высокую аффинность к HER3. В определенных вариантах осуществления в рамках изобретения антитело или наноантитело животных семейства верблюжьих продуцируется естественным образом у верблюда, т.е. продуцируется у животного семейства верблюжьих после иммунизации HER3 или его пептидным фрагментом, с использованием способов, описанных в настоящем документе для других антител. Альтернативно, наноантитело животных семейства верблюжьих против HER3 конструируют способами инженерии, т.е. получают путем селекции, например, из библиотеки фага, экспонирующего надлежащим образом подвергнутые мутагенезу белки наноантител верблюда с использованием методик пэннинга с HER3 в качестве мишени, как описано в примерах настоящего описания. Сконструированные антитела, кроме того, могут быть изготовлены способами генной инженерии так, чтобы они имели время полужизни у реципиента от 45 мин до двух недель. В конкретном варианте осуществления антитело или наноантитело животных семейства верблюжьих получают путем пересадки последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи антител человека по изобретению в каркасные последовательности наноантитела или однодоменного антитела, как описано, например, в PCT/EP93/02214. В одном варианте осуществления антитело или наноантитело животных семейства верблюжьих связывается 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. В одном варианте осуществления антитело или наноантитело животных семейства верблюжьих связывается 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 поливалентные антитела.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к бипаратопным, биспецифическим или полиспецифическим молекулам, содержащим связывающее HER3 антитело или его фрагмент по изобретению. Антитело по изобретению или его фрагменты можно преобразовывать в производное или связывать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело по изобретению в действительности можно преобразовывать в производное или связывать более чем с одной другой функциональной молекулой с получением бипаратопных или полиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными участками связывания и/или молекулами-мишенями; для таких бипаратопных или полиспецифических молекул. Для получения биспецифической молекулы по изобретению антитело по изобретению можно функционально связывать (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающийся миметик, так чтобы получить биспецифическую молекулу.

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

Биспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать путем конъюгации составляющих их специфичностей связывания с использованием способов, известных в данной области. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичности связывания представляют собой специфичность связывания белков или пептидов, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие и сшивающие средства. Примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтоацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеинимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например, Karpovsky et al., (1984), *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8648). Другие способы

включают способы, описанные в Paulus (1985), Behring Ins. Mitt. No. 78:118-132; Brennan et al., (1985), Science 229:81-83), и Glennie et al., (1987), J. Immunol. 139:2367-2375). Конъюгирующие агенты представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба из которых доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичность связывания представляет собой специфичность связывания антител, их можно конъюгировать с помощью образования сульфгидрильных связей между С-концами шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления шарнирная область модифицирована так, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, например один, перед конъюгацией.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут кодироваться в одном векторе и экспрессироваться и собираться в одном и том же хозяине. Этот способ особенно пригоден, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')<sub>2</sub> или лиганд×Fab. Биспецифическая молекула по изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунного анализа (REA), FACS-анализа, биоанализа (например, ингибирование роста) или вестерн-блот-анализа. Каждый из этих анализов, главным образом, выявляет присутствие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного к представляющему интерес комплекс.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к поливалентным соединениям, содержащим по меньшей мере два идентичных или различных фрагмента антител, связывающихся с HER3. Фрагменты антител можно связывать друг с другом путем слияния белков или ковалентного или нековалентного связывания. Четырехвалентные соединения можно получать, например, сшиванием антител по изобретению с антителом, которое связывается с константными областями антител по изобретению, например Fc-или шарнирной областью. Домен тримеризации описан, например, в патенте Borean EP 1012280B1. Пентамеризующие модули описаны, например, в PCT/EP97/05897.

В одном варианте осуществления бипаратопная/биспецифическая молекула связывается с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 HER3.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителам с двойной функцией, в которых одно моноклональное антитело модифицировано так, что антигенсвязывающий участок связывает более одного антигена, таким как антитело с двойной функцией, которое связывается как с HER3, так и с другим антигеном (например, HER1, HER2 и HER4). В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу с двойной функцией, которое нацелено на антигены, имеющие одну и ту же конформацию, например антигены, которые обладают той же конформацией, что и HER3 в "закрытом" или "неактивном" состоянии. Примеры антигенов с той же конформацией, что и у HER3 в "закрытой" или "неактивном" состоянии, включают, но не ограничиваются ими, HER1 и HER4. Таким образом, антитело с двойной функцией может связываться как с HER3, так и с HER1; как с HER3, так и с HER4 или как с HER1, так и с HER4. Специфичность двойного связывания антитела с двойной функцией может далее переходить в двойную активность или ингибирование активности. (См., например, Jenny Bostrom et al., (2009), Science: 323; 1610-1614).

Антитела с увеличенным временем полужизни.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком HER3, которые обладают увеличенным временем полужизни *in vivo*.

На время полужизни белка *in vivo* может влиять множество факторов. Их примером является почечная фильтрация, метаболизм в печени, деградация протеолитическими ферментами (протеазами) и иммуногенные ответы (например, нейтрализация белка антителами и захват макрофагами и дендритными клетками). Для продления времени полужизни антител по настоящему изобретению можно использовать различные стратегии. Их примерами являются химическое связывание с полиэтиленгликолем (PEG), геCODE PEG, остовом антител, полисиаловой кислотой (PSA), гидроксипропилкрахмалом (HES), альбуминсвязывающими лигандами и углеводными экранами; генетическое слияние с белками, связывающимися с сывороточными белками, такими как альбумин, IgG, FcRn и трансферрин; связывание (генетически или химически) с другими связывающимися частями, которые связываются с белками сыворотки, такими как наноантитела, Fab, DARPin, авимеры, аффитела и антикалины; генетическое слияние с rPEG, альбумином, доменом альбумина, связывающимися альбумин белками и Fc; или включение в наноносители, составы с медленным высвобождением или медицинские устройства.

Для продления циркуляции антител в сыворотке *in vivo* инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный PEG, можно связывать с антителами или фрагментами с помощью многофункционального линкера или без него, путем сайт-специфической конъюгации PEG с N- или С-концом антител

или с помощью эpsilon-аминогрупп, присутствующих на остатках лизина. Для пегилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, подвергают реакции с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реактивное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых одна или несколько групп PEG становятся связанными с антителом или фрагментом антитела. Пегилирование можно проводить с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реактивной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным растворимым в воде полимером). Как используют в рамках изобретения, термин "полиэтиленгликоль" охватывает любые из форм PEG, которые используют для преобразования других белков, такие как моно(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. В определенных вариантах осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Можно использовать преобразование в производное с помощью линейного или разветвленного полимера, которое приводит к минимальной утрате биологической активности. Степень конъюгации можно тщательно подвергать мониторингу с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрии для обеспечения надлежащей конъюгации молекул PEG с антителами. Не вступивший в реакцию PEG можно отделять от конъюгатов антитело-PEG эксклюзионной или ионообменной хроматографией. Преобразованные с помощью PEG антитела можно исследовать в отношении активности связывания, а также в отношении эффективности *in vivo* с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, например, способами иммуноанализа, описанными в настоящем документе. Способы пегилирования белков известны в данной области, и их можно применять для антител по изобретению. См., например, EP 0154316, Nishimura et al., и EP 0401384, Ishikawa et al.

Другие модифицированные технологии пегилирования включают технологию химической ортогонально-направленной инженерии реконструирования (reCODE PEG), которая встраивает боковые цепи с определенным химическим составом в биосинтетические белки с помощью системы восстановления, которая включает тРНК-синтазу и тРНК. Эта технология обеспечивает включения более 30 новых аминокислот в биосинтетические белки в клетках *E. coli*, дрожжей и млекопитающих. тРНК включает ненативную аминокислоту в любом месте, где расположен кодон amber, преобразуя amber из стоп-кодона в кодон, который является сигналом для включения химически определенной аминокислоты.

Также для удлинения времени полужизни в сыворотке можно использовать технологию рекомбинантного пегилирования (rPEG). Эта технология вовлекает генетическое слияние неструктурированного белкового хвоста из 300-600 аминокислот с существующим фармацевтическим белком. Вследствие того, что кажущаяся молекулярная масса такой неструктурированной белковой цепи приблизительно в 15 раз больше, чем его истинная молекулярная масса, время полужизни белка в сыворотке значительно увеличивается. В противоположность традиционному пегилированию, которое требует химической конъюгации и повторной очистки, процесс изготовления значительно упрощен, и продукт является однородным.

Полисиалирование является другой технологией, в которой используется природный полимер полисиаловая кислота (PSA) для продления времени активной жизни и увеличения стабильности терапевтических пептидов и белков. PSA представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При использовании для доставки лекарственных средств на основе белков и терапевтических пептидов полисиаловая кислота обеспечивает защитное микроокружение при конъюгации. Это увеличивает время активной жизни терапевтического белка в кровотоке и препятствует его распознаванию иммунной системой. Полимер PSA естественным образом встречается в организме человека. Он был перенят определенными бактериями, которые эволюционировали на протяжении миллионов лет, для покрытия их стенок им. Эти встречающиеся в природе полисиалированные бактерии затем были способны вследствие молекулярной мимикрии избегать защитной системы организма. PSA, природную технологию предельной скрытности, можно легко получать из таких бактерий в больших количествах и с заданными физическими характеристиками. Бактериальная PSA является полностью неиммуногенной, даже когда она связана с белками, поскольку она химически идентична PSA в организме человека.

Другая технология включает применение производных гидроксиэтилкрахмала ("HES"), связанных с антителами. HES представляет собой модифицированный природный полимер, происходящий из воскового кукурузного крахмала, и он может метаболизироваться ферментами организма. Растворы HES обычно вводят для замещения дефицита объема крови и для улучшения реологических свойств крови. Хесилирование антитела обеспечивает продление времени полужизни в кровотоке путем увеличения стабильности молекулы, а также путем снижения выведения почками, что приводит к увеличенной биологической активности. Варьируя различные параметры, такие как молекулярная масса HES, можно изготавливать широкий диапазон конъюгатов антител с HES.

Антитела, имеющие увеличенное время полужизни *in vivo*, также можно получать путем внесения одной или нескольких аминокислотных модификаций (т.е. замен, инсерций или делеций) в константный домен IgG или в его связывающий фрагмент FcRn (предпочтительно Fc-фрагмент или фрагмент Fc-домена шарнирной области). См., например, международную публикацию № WO 98/23289; международную публикацию № WO 97/34631 и патент США № 6277375.

Кроме того, антитела можно конъюгировать с альбумином, чтобы антитела или их фрагменты были более стабильными *in vivo* или чтобы они имели большее время полужизни *in vivo*. Способы для этого хорошо известны в данной области, см., например, международные публикации № WO 93/15199,

WO 93/15200 и WO 01/77137 и патент Европы № EP 413622.

Антитело против HER3 или его фрагмент также могут быть слитыми с одним или несколькими полипептидами сывороточного альбумина человека (HSA) или их частями. HSA, белок длиной 585 аминокислот в зрелой форме, ответственен за существенную часть осмотического давления в сыворотке и также функционирует в качестве переносчика эндогенных и экзогенных лигандов. Роль альбумина в качестве молекулы-переносчика и инертная природа являются желательными свойствами для применения в качестве носителя и переносчика полипептидов *in vivo*. Применение альбумина в качестве компонента слитого с альбумином белка в качестве переносчика для различных белков было предложено в WO 93/15199, WO 93/15200 и EP 413622. Также было предложено применение N-концевых фрагментов HSA для слияния с полипептидами (EP 399666). Таким образом, путем генетического или химического слияния или конъюгации антител или их фрагментов с альбумином можно стабилизировать или продлевать время полужизни и/или сохранять активность молекулы в течение длительных периодов времени в растворе, *in vitro* и/или *in vivo*.

Слияние альбумина с другим белком можно осуществлять путем генетического манипулирования так, чтобы ДНК, кодирующая HSA или его фрагмент, была связана с ДНК, кодирующей белок. Затем пригодного хозяина трансформируют или трансфицируют слитыми нуклеотидными последовательностями, расположенными так на подходящей плазмиде, чтобы экспрессировался слитый полипептид. Экспрессию можно осуществлять *in vitro*, например, из прокариотических или эукариотических клеток или *in vivo*, например, из трансгенного организма. Дополнительные способы, касающиеся слияния с HSA, могут быть найдены, например, в WO 2001/077137 и WO 2003/06007, включенных в настоящее описание в качестве ссылки. В конкретном варианте осуществления экспрессию слитого белка проводят в клеточных линиях млекопитающих, например клеточных линиях CHO. Также предусматривается, что в объем изобретения входит измененное отличающееся связывание антитела с рецептором при низких или высоких значениях pH. Например, аффинность антитела можно модифицировать так, чтобы оно оставалось связанным с его рецептором при низком значении pH, например низком значении pH в лизосоме, путем модификации антитела так, чтобы оно включало дополнительные аминокислоты, такие как гистидин, в CDR антитела (См., например, Tomoyuki Igawa et al. (2010), Nature Biotechnology; 28, 1203-1207).

Конъюгаты антител.

Настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые специфично связываются с белком HER3, рекомбинантно слитым или химически конъюгированным (включая как ковалентную, так и нековалентную конъюгацию) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно с полипептидом по меньшей мере из 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) с получением слитых белков. В частности, изобретение относится к слитым белкам, содержащим фрагмент антитела, описанного в настоящем описании (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv фрагмент, F(ab)<sub>2</sub>-фрагмент, VH-домен, CDR VH, VL-домен или CDR VL), и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Способы слияния или конъюгации белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны в данной области. См., например, патенты США № 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851 и 5112946; патенты Европы № EP 307434 и EP 367166; международные публикации № WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539; Zheng et al., (1995), J. Immunol. 154:5590-5600; и Vil et al., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341.

Дополнительные слитые белки можно получать способами шаффлинга генов, шаффлинга мотивов, шаффлинга экзонов и/или шаффлинга кодонов (совокупно называемыми "шаффлингом ДНК"). Шаффлинг ДНК можно использовать для изменения активностей антител по изобретению или их фрагментов (например, антител или их фрагментов с более высокой аффинностью и более низкими скоростями диссоциации). См., в общем, патенты США № 5605793; 5811238; 5830721; 5834252 и 5837458; Patten et al., (1997), Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Narayana, (1998), Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., (1999), J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, (1998), Biotechniques, 24(2):308-313 (каждый из этих патентов и публикаций включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Антитела или их фрагменты, или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять, подвергая их случайному мутагенезу с помощью ПЦР с пониженной точностью, случайному встраиванию нуклеотидов или другим способам, перед рекомбинацией. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, который специфично связывается с белком HER3, можно рекомбинировать с одним или несколькими компонентами, мотивами, отрезками, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или нескольких гетерологичных молекул.

Более того, антитела или их фрагменты можно подвергать слиянию с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид, такой как метка, предоставляемая в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку слитого

белка. Другие пептидные метки, пригодные для очистки, включают, но не ограничиваются ими, гемагглютининовую ("НА") метку, которая соответствует эпитопу, происходящему из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., (1984), Cell 37:767), и "flag"-метку.

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их фрагменты конъюгированы с диагностическим или поддающимся детекции агентом. Такие антитела могут быть пригодны для мониторинга или прогнозирования возникновения, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или нарушения в качестве части процедуры клинического исследования, такого как определение эффективности конкретной терапии. Такую диагностику и обнаружение можно проводить путем связывания антитела с поддающимися обнаружению веществами, включая, но не ограничиваясь ими, различные ферменты, такие как, но не ограничиваясь ими, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как, но не ограничиваясь ими, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, йод ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  и  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), сера ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), индий ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$  и  $^{111}\text{In}$ ), технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ), таллий ( $^{201}\text{Tl}$ ), галлий ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), палладий ( $^{103}\text{Pd}$ ), молибден ( $^{99}\text{Mo}$ ), ксенон ( $^{133}\text{Xe}$ ), фтор ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{113}\text{Sn}$  и  $^{117}\text{Tl}$ ; и позитронно-активные материалы с использованием различных способов позитронно-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает применение антител или их фрагментов, конъюгированных с терапевтической частью. Антитело или его фрагмент можно конъюгировать с терапевтической частью, такой как цитотоксин, например цитостатический или цитотоксичный агент, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла, например альфа-излучателя. Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является вредоносным для клеток.

Кроме того, антитело или его фрагмент можно конъюгировать с терапевтической частью или частью лекарственного средства, которая модифицирует данный биологический ответ.

Терапевтические части или части лекарственного средства не следует истолковывать как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, часть терапевтического средства может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающий желательной 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,  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, тканевой активатор плазминогена, апоптотический агент, антиапоптотический агент; или модификатор биологического ответа, например, такой как лимфокин. В одном варианте осуществления антитело против HER3 или его фрагмент конъюгированы с терапевтической частью, такой как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты называют в настоящем описании "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько цитотоксинов, называют "иммуноконъюгатами". Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является вредоносным (например, уничтожает) для клеток. Его примеры включают таксон, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, т. колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), абляционные средства (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин С и цисдихлордиаминпалладий(II) (DDP), цисплатин, антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)), и антимиотические средства (например, винкристин и винбластин). (См., например, Seattle Genetics US20090304721).

Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом по изобретению, включают дуокармицины, калихеамицины, майтанзины и ауристатины и их производные. Пример конъюгата калихеамицин-антитело коммерчески доступен (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Цитотоксины можно конъюгировать с антителами по изобретению с использованием технологии линкеров, доступной в данной области. Примеры типов линкеров, которые используют для конъюгации цитотоксина с антителом, включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, простые тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и содержащие пептид линкеры. Можно выбирать линкер, который, например, является чувствительным к расщеплению при низких значениях pH в лизосомальном компартменте или является чувствительным к расщеплению протеазами, такими как протеазы, предпочтительно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).



Для дальнейшего обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических средств с антителами, также см. Saito et al., (2003), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail et al., (2003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003), *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002), *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002), *Curr. Opin. Investig. Drug* 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитела по настоящему изобретению также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических препаратов, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностических или терапевтических целях, включают, но не ограничиваются ими, йод<sup>131</sup>, индий<sup>111</sup>, иттрий<sup>90</sup> и лютеций<sup>177</sup>. Способ получения радиоиммуноконъюгатов является общепринятым в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, включая Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) и Веххаг™ (Coriga Pharmaceuticals), и для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител по изобретению можно использовать сходные способы. В определенных вариантах осуществления макроциклическим хелатором является 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота (DOTA), которая может быть связана с антителом через линкерную молекулу. Такие линкерные молекулы широко известны в данной области и описаны в Denardo et al., (1998), *Clin. Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson et al., (1999), *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; и Zimmerman et al., (1999), *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50, каждый из которых включен в качестве ссылки в полном объеме.

Способы конъюгации терапевтических частей с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery* (2<sup>nd</sup> Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., (1982), *Immunol. Rev.* 62:119-58.

Антитела также можно связывать с твердыми подложками, которые, в частности, пригодны для иммуноанализа или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают, но не ограничиваются ими, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Комбинации антител.

В другом аспекте изобретение относится к антителам против HER3 или их фрагментам по изобретению, используемым с другими терапевтическими средствами, такими как другие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, ингибиторы mTOR или ингибиторы PI3-киназы. Примеры включают, но не ограничиваются ими, следующие.

Ингибиторы HER1: Антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами HER1, которые включают, но не ограничиваются ими, матузумаб (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаб (Imclone), Vectibix®/панитумумаб (Amgen), mAb 806 и нимотузумаб (TheraCIM), Iressa®/гефитиниб (Astrazeneca); CI-1033 (PD183805) (Pfizer), лапатиниб (GW-572016) (GlaxoSmithKline), Tykerb®/лапатиниба дитозилат (SmithKlineBeecham), Tarceva®/эрлотиниб HCL (OSI-774) (OSI Pharma) и PKI-166 (Novartis), и N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[3(S)-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4(диметиламино)-2-бутенамид, продаваемый под торговым названием Tovok® (от Boehringer Ingelheim).

Ингибиторы HER2: Антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами HER2, которые включают, но не ограничиваются ими, пертузумаб (продаваемый под торговым названием Omnitarg®, Genentech), трастузумаб (продаваемый под торговым названием Herceptin®, Genentech/Roche), MM-111, нератиниб (также известный как НКI-272, (2E)-N-[4-[[3-хлор-4-[(пиримидин-2-ил)метокси]фенил]амино]-3-циано-7-этоксихинолин-6-ил]-4-(диметиламино)бут-2-енамид, и описанный в публикации № WO 05/028443), лапатиниб или лапатиниба дитозилат (продаваемые под торговым названием Tykerb®, GlaxoSmithKline).

Ингибиторы HER3: Антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами HER3, которые включают, но не ограничиваются ими, MM-121, MM-111, IB4C3, 2DID12 (U3 Pharma AG), AMG888 (Amgen), AV-203 (Aveo), MEHD7945A (Genentech) и низкомолекулярные соединения, которые ингибируют HER3.

Ингибиторы HER4: Антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами HER4.

Ингибиторы PI3K: Антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами PI3-киназы, которые включают, но не ограничиваются ими, 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный 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-c]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный

как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в публикации PCT № WO 06/122806), ВМК120 и ВУЛ719).

Ингибиторы mTOR: антитела против HER3 или их фрагменты можно использовать с ингибиторами mTOR, которые включают, но не ограничиваются ими, темсиролиму (продаваемый под торговым названием Torisel®, Pfizer), ридафоролиму (ранее известный как дефоролиму, (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]гекса-триаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как дефоролиму, AP23573 и МК8669 (Ariad Pharm.) и описанный в публикации PCT № WO 03/064383), эверолиму (RAD001) (продаваемый под торговым названием Afinitor®, Novartis). Одно или несколько терапевтических средств можно вводить либо одновременно, либо после введения антитела против HER3 или его фрагмента по настоящему изобретению.

#### Способы получения антител по изобретению

(i) Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела.

Изобретение относится по существу к очищенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, содержащие сегменты или домены цепей связывающего HER3 антитела, описанные выше. Некоторые из нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против HER3. В конкретном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы, указанные в табл. 1. Некоторые другие молекулы нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотидные последовательности, которые по существу идентичны (например, по меньшей мере на 65, 80, 95 или 99%) нуклеотидным последовательностям, указанным в табл. 1. При экспрессии с соответствующих экспрессирующих векторов полипептиды, кодируемые этими полинуклеотидами, способны проявлять способность связывания антигена HER3.

Также изобретение предусматривает полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере одну область CDR и обычно все три области CDR из тяжелой или легкой цепи связывающего HER3 антитела, указанного выше. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют всю или по существу всю последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи связывающего HER3 антитела, указанного выше. Вследствие вырожденности кода различные последовательности нуклеиновых кислот кодируют каждую из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина.

Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению могут кодировать как вариабельную область, так и константную область антитела. Некоторые из последовательностей нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80, 90 или 99%) последовательности зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела против HER3, указанной в табл. 1. Некоторые другие последовательности нуклеиновых кислот содержат нуклеотиды, кодирующие последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80, 90 или 99%) последовательности зрелой вариабельной области легкой цепи антитела против HER3, указанной в табл. 1.

Полинуклеотидные последовательности можно получать способом твердофазного синтеза ДНК *de novo* или ПЦР-мутагенезом существующей последовательности (например, последовательности, как описано в примерах ниже), кодирующей связывающее HER3 антитело или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно проводить способами, известными в данной области, такими как фосфотриэфирный способ Narang et al., (1979), Meth. Enzymol. 68:90; фосфодиэфирный способ Brown et al., (1979), Meth. Enzymol. 68:109; диэтилфосфорамидитный способ Beaucage et al., (1981), Tetra. Lett., 22:1859; и способ с твердой подложкой согласно патенту США № 4458066. Внесение мутаций в полинуклеотидную последовательность способом ПЦР можно проводить, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., (1991), Nucleic Acids Res. 19:967; и Eckert et al., (1991), PCR Methods and Applications, 1:17.

Также изобретение предусматривает экспрессирующие векторы и клетки-хозяева для продуцирования связывающих HER3 антител, описанных выше. Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи связывающих против HER3 антител или их связывающие фрагменты, можно использовать различные экспрессирующие векторы. Для продуцирования антител в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать как векторы на основе вируса, так и невирусные экспрессирующие векторы. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомальные векторы, как правило, с экспрессирующей кассетой для экспрессирующего белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., (1997), Nat. Genet. 15:345). Например, невирусные векторы, пригодные для экспрессии связывающих HER3 полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, человека), включают pThioHis A, B и C, pCDNA3. 1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, San Diego, CA), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные в данной области для экспрессии других белков. Пригодные

вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, герпесвирусов, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent et al., (1995) выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807; и Rosenfeld et al., (1992), *Cell* 68:143.

Выбор экспрессирующего вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых вектор будет экспрессироваться. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь связывающего HER3 антитела или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления используют индуцибельный промотор для предотвращения экспрессии встроенных последовательностей, за исключением случая, когда они находятся в индуцирующих условиях. Индуцибельные промоторы включают, например, промотор арабинозы, *lacZ*, металлотионеина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножить в неиндуцирующих условиях без смещения популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, также для эффективной экспрессии цепи связывающего HER3 антитела или ее фрагмента могут потребоваться или быть желательными другие регуляторные элементы. Эти элементы, как правило, включают кодон инициации ATG и соседний участок связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно усиливать включением энхансеров, пригодных для используемой клеточной системы (см., например, Scharf et al., (1994), *Results Probl. Cell Differ.* 20:125; и Bittner et al., (1987), *Meth. Enzymol.*, 153:516). Например, можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

Экспрессирующие векторы также могут обеспечивать сигнальную последовательность для секреции, помещенную так, чтобы образовывать слитый белок с полипептидами, кодируемыми встроенными последовательностями связывающего HER3 антитела. Более часто, встроенные последовательности связывающего HER3 антитела связаны с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, подлежащие применению для встраивания в них последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепи связывающего HER3 антитела, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы позволяют экспрессию переменных областей в качестве слитых белков с константными областями, тем самым обеспечивая продуцирование интактных антител или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева для содержания и экспрессии цепей связывающих HER3 антител могут быть либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E. coli* является одним из прокариотических хозяев, пригодных для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, пригодные для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получать экспрессирующие векторы, которые, как правило, содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, ориджин репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, необязательно с последовательностью оператора, и имеют последовательности участка связывания рибосом и т.п. для начала и завершения транскрипции и трансляции. Также для экспрессии связывающих HER3 полипептидов по изобретению можно использовать другие микробы, такие как дрожжи. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления для экспрессии и продуцирования связывающих HER3 полипептидов используют клетки-хозяева млекопитающих. Например, они могут представлять собой либо клеточную линию гибридомы, экспрессирующую эндогенные гены иммуноглобулинов (например, клон гибридомы миеломы 1D6.C9, как описано в примерах), либо клеточную линию млекопитающих, содержащую экзогенный экспрессирующий вектор (например, клетки миеломы SP2/0, проиллюстрированные ниже). Они включают нормальные мортальные или нормальные или аномальные бессмертные клетки животных или человека. Например, был разработан ряд пригодных линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии CHO, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов рассмотрено, главным образом, например, в Winnacker, *FROM GENES TO CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как ориджин репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., (1986), *Immunol. Rev.* 89:49-68), и необходимые участки для информационного процессинга, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Эти экспрессирующие векторы обычно содержат промоторы, происходящие из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Пригодные промоторы могут быть конститутивными, специфичными к типу клеток, специфичными к стадии и/или модулируемыми или регулируемым. Пригодные промоторы

включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотioneина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор роIII MRP, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как предранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области.

Способы введения экспрессирующих векторов, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, варьируют, в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию с помощью хлорида кальция часто используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (См. главным образом, Sambrook, et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредуемую липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, "оголенную" ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, (1997) Cell 88:223), усиливаемый агентами захват ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительного продуцирования рекомбинантных белков с высоким выходом часто является желательной стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют цепи связывающих HER3 антител или их связывающие фрагменты, можно получать с использованием экспрессирующих векторов по изобретению, которые содержат вирусные орджины репликации или эндогенные экспрессирующие элементы и ген селективного маркера. После введения вектора клеткам можно позволять расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде перед переключением их на селективную среду. Назначением селективного маркера является обеспечение устойчивости к селекции, и его присутствие позволяет рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективной среде. Пролиферацию устойчивых, стабильно трансфицированных клеток можно обеспечивать с использованием способов культивирования тканей, пригодных для данного типа клеток.

(ii) Получение моноклональных антител по изобретению.

Моноклональные антитела (mAb) можно получать различными способами, включая общепринятые методологии моноклональных антител, например, стандартный способ гибридизации соматических клеток, Kohler and Milstein, (1975), Nature, 256:495. Можно использовать множество способов получения моноклонального антитела, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов.

Системой на животных для получения гибридом является система на мышах. Получение гибридомы в мышья является общепринятой методикой. Протоколы и способы иммунизации для выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Также известны партнеры по слиянию (например, клетки миеломы мышья) и методики слияния.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению можно получать на основе последовательности моноклонального антитела мышья, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую иммуноглобулины тяжелой и легкой цепей, можно получать из представляющей интерес гибридомы мышья и модифицировать способами инженерии так, чтобы она содержала не являющиеся мышьиными (например, человеческие) последовательности иммуноглобулинов с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области мышья можно связывать с константными областями человека с использованием способов, известных в данной области (см. например, патент США № 4816567, выданный Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела CDR-области мышья можно встраивать в каркасную область человека с использованием способов, известных в данной области. См., например, патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.

В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против HER3, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышья, имеющих части иммунной системы человека, а не системы мышья. Эти трансгенные и трансхромосомные мышья включают мышья, называемых в настоящем описании мышьями HuMAb и мышьями KM соответственно, и их в совокупности называют в настоящем описании "мышьями с Ig человека".

Мышь HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) содержит мини-локусы генов иммуноглобулинов человека, которые кодируют не подвергнутые реаранжировке последовательности тяжелой цепи ( $\mu$  и  $\gamma$ ) и легкой цепи к иммуноглобулина человека, вместе с целенаправленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей  $\mu$  и  $\kappa$  (см., например, Lonberg, et al., (1994), Nature, 368(6474): 856-859). Таким образом, мышья проявляют сниженную экспрессию IgM или  $\kappa$  мышья, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека претерпевают переключение классов и соматическую мутацию, формируя высокоаффинные моноклональные IgGK-антитела человека (Lonberg et al., (1994) выше; рассмотрено в Lonberg, (1994), Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg and Huszar, (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, и Harding and Lonberg, (1995), Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). Получение и применение мышья HuMAb, и геномные модификации, осуществляемые такими мышьями, кроме того, описаны в Taylor et al., (1992), Nucleic Acids Research, 20:6287-6295; Chen et al., (1993),

International Immunology, 5: 647-656; Tuailleon et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3720-3724; Choi et al., (1993), Nature Genetics, 4:117-123; Chen et al., (1993), EMBO J. 12:821-830; Tuailleon et al., (1994), J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al., (1994), International Immunology, 579-591; и Fishwild et al., (1996), Nature Biotechnology, 14: 845-851, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Кроме того, см. патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все выданы Lonberg and Kay; патент США № 5545807, выданный Surani et al.; публикации PCT № WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все выданы Lonberg and Kay; и публикацию PCT № WO 01/14424, выданную Korman et al.

В другом варианте осуществления антитела человека по изобретению можно индуцировать с использованием мыши, которая имеет последовательности иммуноглобулинов человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая имеет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем описании "мышами КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478, Ishida et al.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и их можно использовать для индукции связывающих HER3 антител по изобретению. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.). Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, выданных Kucherlapati et al.

Более того, в данной области доступны альтернативные трансхромосомные системы на животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и их можно использовать для индукции связывающих HER3 антител по изобретению. Например, можно использовать мышей, имеющих как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, называемых "мышами ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al., (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Более того, в данной области описаны коровы, имеющие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa et al., (2002), Nature Biotechnology 20:889-894), и их можно использовать для индукции связывающих HER3 антител по изобретению.

Моноклональные антитела человека по изобретению также можно получать с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека являются общепринятыми в данной области или описаны в примерах ниже. См. например: патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698, выданные Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717, выданные Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197, выданные McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданные Griffiths et al.

Моноклональные антитела человека по изобретению также можно получать с использованием мышей SCID, в которых воссозданы иммунные клетки человека, так чтобы при иммунизации можно было достигнуть ответа антител человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767, выданных Wilson et al.

(iii) Модифицирование способами инженерии каркасные области или Fc.

Модифицированные способами инженерии антитела по изобретению включают антитела, в которых в каркасные остатки в VH и/или VL внесены модификации, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасной области вносят для снижения иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является "обратная мутация" одного или нескольких каркасных остатков на соответствующую последовательность эмбрионального типа. Более конкретно, антитело, которое претерпело соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности эмбрионального типа, из которой антитело происходит. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антител с последовательностями эмбрионального типа, из которых антитело происходит. Для возвращения последовательностям каркасной области их конфигурации эмбрионального типа соматические мутации можно подвергать "обратной мутации" на последовательность эмбрионального типа, например, с помощью сайт-направленного мутагеназа. Такие подвергнутые "обратной мутации" антитела также охватываются изобретением.

Другой тип модификации каркасной области вовлекает внесение мутации одного или нескольких остатков в каркасную область, или даже в одну или несколько областей CDR, для удаления Т-клеточных эпитопов, тем самым снижая потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называют "деиммунизацией", и он более подробно описан в публикации патента США № 20030153043, Carr et al.

Дополнительно или альтернативно, модификациям, внесенным в каркасные области или в области CDR, антитела по изобретению можно модифицировать способами инженерии так, чтобы они включали модификации в Fc-области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело по изобретению можно химически модифицировать (например, к антителу можно присоединять одну или несколько химических частей), или их можно модифицировать для изменения его гликозилирования, вновь для изменения одного

или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области представляет собой нумерацию согласно индексу EU по Kabat.

В одном варианте осуществления шарнирную область СН1 модифицируют так, чтобы изменялось количество остатков цистеина в шарнирной области, например, увеличивалось или снижалось. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425, выданном Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления в Fc-шарнирную область антитела вносят мутацию для снижения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вносят в область контакта доменов СН2-СН3 фрагмента Fc-шарнирная область так, чтобы указанное антитело имело сниженное связывание стафилококкового белка А (SpA) относительно связывания нативного Fc-шарнирного домена с SpA. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6165745, Ward et al.

В другом варианте осуществления Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменять отличающимся аминокислотным остатком, так чтобы указанное антитело имело измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняло способность исходного антитела связывать антиген. Эффекторный лиганд, в отношении которого изменяют аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, оба выданы Winter et al.

В одном варианте осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять отличающимся аминокислотным остатком, так чтобы указанное антитело имело измененное связывание C1q и/или сниженную или устраненную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патентах США № 6194551, выданных Idusogie et al.

В одном варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют так, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в публикации PCT WO 94/29351, Bodmer et al.

В другом варианте осуществления Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или увеличения аффинности антитела к Fc $\gamma$ -рецептору путем модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход дополнительно описан в публикации PCT WO 00/42072, Presta. Более того, были картированы участки связывания на IgG1 для Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII и FcRn, и были описаны варианты с усиленным связыванием (см. Shields et al., (2001), J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

В другом варианте осуществления модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е. антитело, лишенное гликозилирования). Гликозилирование можно изменять, например, для увеличения аффинности антитела к антигену. Такие модификации углеводами можно проводить, например, путем изменения одного или нескольких участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно вносить одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или нескольких каркасных участков гликозилирования вариабельной области, тем самым устраняя гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Такой подход дополнительно описан в патентах США № 5714350 и 6350861, Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно получать антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенное содержание бис-секторных структур GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования увеличивают способность антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно проводить, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования описаны в данной области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению, чтобы тем самым получить антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195, Hang et al., описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835, Presta, описан вариант клеточной линии CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к связанному с Asn(297) углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (также см. Shields et al., (2002), J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342, Umana et al., описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в модифицированных способами инженерии клеточных

линиях, проявляют увеличенное содержание биссекторных структур GlcNac, что приводит к увеличенной активности ADCC антител (также см. Umana et al., (1999), Nat. Biotech. 17:176-180).

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно вносить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, выданном Ward. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни антитело можно изменять в области CH1 или CL, чтобы оно содержало связывающий рецептор спасения эпителий, состоящий из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022, выданных Presta et al.

(iv) Способы инженерии для измененных антител.

Как рассмотрено выше, связывающие HER3 антитела, имеющие последовательности VH и VL или полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепей, представленные в настоящем описании, можно использовать для создания новых связывающих HER3 антител путем модификации полноразмерной последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательностей VH и/или VL, или константной области(ей), связанной с ними. Таким образом, в другом аспекте изобретения структурные признаки связывающего HER3 антитела по изобретению используют для создания структурно сходных связывающих HER3 антител, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, такое как связывание с HER3 человека, а также ингибирование одного или нескольких функциональных свойств HER3. Например, одну или несколько областей CDR антител по настоящему изобретению или их мутантных вариантов можно рекомбинантно комбинировать с известными каркасными областями и/или другими CDR с получением дополнительных рекомбинантно сконструированных связывающих HER3 антител по изобретению, как рассмотрено выше. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предшествующем разделе. Исходным материалом для способа инженерии является одна или нескольких последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или одна или несколько их областей CDR. Для создания модифицированного способами инженерии антитела необязательно в действительности получать (т.е. экспрессировать в качестве белка) антитело, имеющее одну или несколько последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или одну или несколько из их областей CDR. Вместо этого информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", происходящей из исходной последовательности(ей), а затем последовательность(и) "второго поколения" получают и экспрессируют в качестве белка.

Таким образом, в другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения связывающего HER3 антитела, состоящего из:

последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из 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, состоящей из 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, состоящей из 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, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из 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, состоящей из 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, состоящей из 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;

изменения по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности варибельной области легкой цепи антитела с получением по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и экспрессии измененной последовательности антитела в качестве белка. Измененную последовательность антитела также можно получать путем скрининга библиотек антител, имеющих фиксированные последовательности CDR3 или минимальные необходимые связывающие детерминанты, как описано в US20050255552, и разнообразие последовательностей CDR1 и CDR2. Скрининг можно проводить с помощью любой технологии скрининга, пригодной для скрининга антител из библиотек антител, такой как технология фагового дисплея.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно использовать стандартные способы молекулярной биологии. Антитело, кодируемое измененной последовательностью(ями) антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, несколько или все из функциональных свойств связывающих HER3 антител, описанных в настоящем документе, где эти функцио-

нальные свойства включают, но не ограничиваются ими, специфичное связывание с HER3 человека и/или яванского макака; связывание антитела с HER3 и нейтрализация биологической активности HER3 путем ингибирования активности передачи сигнала HER в анализе гена фосфо-HER.

Функциональные свойства измененных антител можно оценивать с использованием стандартных анализов, доступных в данной области и/или описанных в настоящем документе, таких как анализы, указанные в примерах (например, ELISA).

В определенных вариантах осуществления способов инженерии антител по изобретению, можно вносить мутации случайным образом или селективно по всей или части кодирующей последовательности связывающего HER3 антитела, и полученные модифицированные связывающие HER3 антитела можно подвергать скринингу в отношении активности связывания и/или других функциональных свойств, как описано в настоящем документе. Способы внесения мутаций описаны в данной области. Например, в публикации PCT WO 02/092780, Short, описаны способы внесения и скрининга мутаций антител с использованием мутагенеза с насыщением, синтетической сборки лигированием или их комбинации. Альтернативно, в публикации PCT WO 03/074679, Lazar et al., описаны способы использования компьютерных способов скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

Характеризация антител по изобретению.

Антитела по изобретению можно охарактеризовывать с помощью различных функциональных анализов. Например, их можно охарактеризовывать по их способности нейтрализовать

биологическую активность путем ингибирования передачи сигнала HER в анализе фосфо-HER, как описано в настоящем документе, по их аффинности к белку HER3 (например, HER3 человека и/или яванского макака), по связыванию эпитопа, по их устойчивости к протеолизу и по их способности блокировать последующую передачу сигнала HER3. Для измерения опосредуемой HER3 передачи сигнала можно использовать различные способы. Например, мониторинг каскада передачи сигнала HER можно осуществлять путем (i) измерения фосфо-HER3; (ii) измерения фосфорилирования HER3 или других нижележащих белков передачи сигнала (например, Akt); (iii) анализов блокирования лиганда, как описано в настоящем документе; (iv) анализа образования гетеродимера; (v) анализа профиля зависимой от HER3 экспрессии генов; (vi) анализа интернализации рецептора и (vii) запускаемых HER3 клеточных фенотипов (например, пролиферация).

Способность антитела связываться с HER3 можно выявлять путем мечения представляющего интерес антитела прямо, или антитело может быть немеченом, и связывание выявляют непрямо с использованием различных форматов сэндвич-анализа, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления связывающие HER3 антитела по изобретению блокируют или конкурируют за связывание полипептида или белка HER3 с эталонным связывающим HER3 антителом. Они могут представлять собой полностью человеческие связывающие HER3 антитела, описанные выше. Также они могут представлять собой другие связывающие HER3 антитела: антитела мыши, химерные или гуманизированные антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело. Способность блокировать или конкурировать с эталонным антителом за связывание указывает на то, что исследуемое связывающее HER3 антитело связывается с тем же или сходным эпитопом, что и эталонное антитело, или с эпитопом, который является достаточно близким к эпитопу, связываемому эталонным антителом против HER3. Особенно вероятно, что такие антитела обладают общими преимущественными свойствами с эталонным антителом. Способность блокировать или конкурировать с эталонным антителом можно определять, например, с помощью конкурентного анализа связывания. С помощью конкурентного анализа связывания исследуемое антитело анализируют в отношении его способности ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как полипептид или белок HER3. Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом за специфическое связывание с антигеном, если избыток исследуемого антитела существенно ингибирует связывание эталонного антитела. Существенное ингибирование означает, что исследуемое антитело снижает специфическое связывание эталонного антитела, как правило, по меньшей мере на 10, 25, 50, 75 или 90%.

Существует ряд известных конкурентных анализов связывания, которые можно использовать для оценки конкуренции связывающего HER3 антитела с эталонным связывающим HER3 антителом за связывание с белком HER3. Они включают, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммуноанализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., (1983), *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (см. Kirkland et al., (1986), *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow & Lane, выше); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием метки I-125 (см. Morel et al., (1988), *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (Cheung et al., (1990), *Virology*, 176:546-552); и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., (1990), *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Как правило, такой анализ вовлекает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченого исследуемого связывающего HER3 антитела и меченого эталонного антитела. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии исследуемого антитела. Обычно исследуемое антитело присут-



ствует в избытке. Антитела, идентифицированные в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связываемому эталонным антителом, чтобы возникало пространственное препятствование.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные связывающие HER3 антитела с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реагентов (например, реагенты от Pierce, Rockford, IL). Конкурентные исследования с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно проводить с использованием планшетов для ELISA, покрытых полипептидом HER3. Связывание биотинилированного МАb можно выявлять с помощью зонда стрептавидин-щелочная фосфатаза. Для определения изотипа очищенного связывающего HER3 антитела можно проводить ELISA изотипов. Например, лунки микропланшетов для титрования можно покрывать 1 мкг/мл антитела против IgG человека в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA планшеты подвергают реакции с 1 мкг/мл или менее моноклонального связывающего HER3 антитела или очищенных изотипических контролей при температуре окружающей среды в течение от 1 до 2 ч. Затем лунки можно подвергать реакции с зондами, конъюгированными с щелочной фосфатазой, специфичными либо к IgG1 человека, либо к IgM человека. Затем планшеты проявляют и анализируют так, чтобы можно было определить изотип очищенного антитела.

Чтобы продемонстрировать связывание моноклональных связывающих HER3 антител с живыми клетками, экспрессирующими полипептид HER3, можно использовать проточную цитометрию. В кратком изложении, клеточные линии, экспрессирующие HER3 (выращенный в стандартных условиях роста), можно смешивать с различными концентрациями связывающего HER3 антитела в PBS, содержащем 0,1% BSA и 10% эмбриональную телячью сыворотку, и инкубировать при 4°C в течение 1 ч. После промывания клетки подвергают реакции с меченым флуоресцеином антителом против IgG человека в тех же условиях, что и окрашивание первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью устройства FACScan с использованием свойств рассеяния света и бокового рассеяния для ограничения единичных клеток. Можно использовать альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии (в дополнение к или вместо анализа проточной цитометрией). Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать флуоресцентной микроскопией. Этот способ позволяет визуализацию отдельных клеток, однако он может иметь сниженную чувствительность, в зависимости от плотности антигена.

Кроме того, связывающие HER3 антитела по изобретению можно исследовать в отношении реактивности к полипептиду HER3 или антигенному фрагменту с помощью вестерн-блоттинга. В кратком изложении, очищенные полипептиды или слитые белки HER3, или экстракты из клеток, экспрессирующих HER3, можно получать и подвергать полиакриламидному гель-электрофорезу с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 10% эмбриональной телячьей сывороткой и обрабатывают моноклональными антителами, подлежащими исследованию.

Связывание IgG человека можно выявлять с использованием антител против IgG человека с щелочной фосфатазой и проявлять с помощью таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Для оценки эффективности и специфичности антител против HER3 можно использовать ряд данных в клеточных анализах индуцированного лигандом образования гетеродимера. Активность можно оценивать по одному или нескольким из следующих.

(i) Ингибирование индуцируемой лигандом гетеродимеризации HER2 с другими представителями семейства EGF в клеточной линии-мишени, например клетках рака молочной железы MCF-7. Иммунопреципитацию комплексов HER2 из клеточных лизатов можно проводить с помощью специфичного к рецептору антитела, и отсутствие/присутствие других рецепторов EGF и биологически соответствующих им лигандов в комплексе можно анализировать после электрофореза/вестерн-переноса путем обработки антителами к другим рецепторам EGF.

(ii) Ингибирование активации каскадов передачи сигнала активированными лигандом гетеродимерами. Ассоциация с HER3 оказалась ключевой для индукции другими представителями семейства рецепторов EGF максимального клеточного ответа после связывания лиганда. В случае HER3 с дефектом киназной активности HER2 обеспечивает функциональный тирозинкиназный домен, позволяя осуществление передачи сигнала после связывания лигандов-факторов роста. Таким образом, клетки, коэкспрессирующие HER2 и HER3, можно обрабатывать лигандом, например херегулином, в отсутствие и в присутствии ингибитора, и можно проводить мониторинг эффекта фосфорилирования тирозина HER3 рядом способов, включая иммунопреципитацию HER3 из обработанных клеточных лизатов и последующий вестерн-блоттинг с использованием антител против фосфотирозина (для деталей см. Agus в цитируемой работе). Альтернативно, можно разрабатывать высокопроизводительный анализ путем улавливания HER3 из солубилизованных лизатов на лунки 96-луночного планшета, покрытого антителом против рецептора HER3, и уровень фосфорилирования тирозина можно измерять с использованием, например,

меченных европием антител против фосфотирозина, как было осуществлено Waddleton et al., (2002), *Anal. Biochem.* 309:150-157.

В расширении этого подхода эффекторные молекулы, известные тем, что они активируются ниже активированных гетеродимеров рецепторов, такие как митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) и Akt, можно анализировать прямо путем иммунопреципитации из обработанных лизатов и блоттинга с антителами, которые выявляют активированные формы этих белков, или путем анализа способности этих белков модифицировать/активировать определенные субстраты.

(iii) Ингибирование индуцируемой лигандом пролиферации клеток. Известно, что множество клеточных линий коэкспрессируют комбинации рецепторов ErbB, например многие клеточные линии рака молочной железы и рака предстательной железы. Анализ можно проводить в форматах 24/48/96-лунок, причем их данные основаны на синтезе ДНК (включение тритированного тимидина), увеличении количества клеток (окрашивание кристаллическим фиолетовым) и т.д.

Ряд данных можно использовать для оценки эффективности и специфичности антител против HER3 в клеточных анализах лиганд-независимого образования гомо- и гетеродимеров. Например, сверхэкспрессия HER2 запускает лиганд-независимую активацию киназного домена в результате спонтанного образования димера. Сверхэкспрессированный HER2 образует либо гомо-, либо гетеродимеры с другими молекулами HER, такими как HER1, HER3 и HER4.

Способность антител или их фрагментов блокировать рост *in vivo* ксенотрансплантатов опухолей из клеточных линий опухолей человека, о которых известно, что их онкогенный фенотип по меньшей мере частично зависит от активации лигандом передачи сигнала гетеродимером HER3, например клетки рака поджелудочной железы VxPC3 и т.д., можно оценивать у мышей с иммунодефицитом либо отдельно, либо в комбинации с соответствующим цитотоксическим средством для рассматриваемой клеточной линии. Примеры функциональных анализов также описаны в разделе "Примеры" ниже.

Профилактическое и терапевтическое применение.

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с каскадом передачи сигнала HER3, путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антител по изобретению. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики злокачественных опухолей (например, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак легкого, множественная миелома, рак яичника, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, остеосаркома, плоскоклеточная карцинома, опухоли оболочки периферических нервов, шваннома, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак пищевода Барретта, глиобластома, светлоклеточная карцинома мягкой ткани, злокачественная мезотелиома, нейрофиброматоз, рак почки, меланома, рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы (БPH), гинекомастия и эндометриоз) путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антител по изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики злокачественных опухолей, ассоциированных с каскадом передачи сигнала HER, путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антител по изобретению.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественных опухолей, ассоциированных с каскадом передачи сигнала HER, которые включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак легкого, множественную миелому, рак яичника, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, остеосаркому, плоскоклеточную карциному, опухоли оболочки периферических нервов, шванному, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак пищевода Барретта, глиобластома, светлоклеточную карциному мягкой ткани, злокачественную мезотелиому, нейрофиброматоз, рак почки, меланому, рак предстательной железы, доброкачественную гиперплазию предстательной железы (БPH), гинекомастию и эндометриоз.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лечению рака пищевода с использованием антител против HER3 или их фрагментов.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лечению доброкачественной гиперплазии предстательной железы (БPH) с использованием антител против HER3 или их фрагментов. БPH является распространенным заболеванием у стареющих мужчин, которое характеризуется незлокачественным увеличением предстательной железы, что приводит к сдавлению уретры и приводит к проблемам с мочеиспусканием и мочевым пузырем (Maharakail W., van Sluijs F.J. & Schalken J.A. 2000, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3, 28-33). Анатомические или микроскопические доказательства БPH присутствуют при аутопсии приблизительно у 55% мужчин в возрасте 60-70 лет. Предпочтительным для выбора способом лечения на протяжении многих лет является трансуретральная резекция предстательной железы. Следовательно, БPH является одной из наиболее распространенных причин для хирургического вмешательства у пожилых мужчин. Менее инвазивные способы лечения включают:

(i) альфа 1-блокаторы (доксазозин, празосин, тамсулозин, теразозин и алфузозин) являются классом лекарственных средств, также используемых для лечения высокого кровяного давления. Эти лекарственные средства расслабляют мышцы шейки мочевого пузыря и предстательной железы, таким образом, обеспечивая более легкое мочеиспускание;

(ii) финастерид и дутастерид снижают уровни андрогенов, таким образом снижая размер предстательной железы, увеличивая скорость потока мочи и снижая симптомы ВРН. Период для обнаружения улучшения симптомов может составить от 3 до 6 месяцев. Потенциальные побочные эффекты, связанные с применением финастерида и дутастерида, включают снижение полового влечения и импотенцию.

Результаты в разделе "Эксперименты" впервые демонстрируют, что ВРН является нейрорегулин-зависимым заболеванием. Также данные демонстрируют, что MOR10703 значительно снижало размер предстательной железы у половозрелых крыс без влияния на уровни гормонов, что указывает на то, что MOR10703 может быть пригодным для лечения ВРН.

Для дальнейшего исследования MOR10703 и других антител против HER3 в качестве терапевтических средств от ВРН полученные хирургически образцы первичной ВРН человека можно трансплантировать бестимусным мышам или крысам и исследовать эффект антител против Her3 с использованием моделей (Otto U. et al. Urol. Int. 1992; 48:167-170). Альтернативно, аспекты ВРН могут быть индуцированы у кастрированных собак посредством длительного введения 5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -диола вместе с эстрадиолом, и антитела против HER3 можно исследовать в этих моделях на собаках (Walsh P.C., J.D. J. Clin. Invest. 1976; 57:1093-1097).

В одном варианте осуществления изобретение относится к лечению гинекомастии с использованием антител против HER3 или их фрагментов. Физическим проявлением гинекомастии является увеличение молочной железы у мужчин, оно обычно происходит в обеих молочных железах, однако иногда происходит только в одной из них, что известно как асимметричная или односторонняя гинекомастия. Гинекомастия обычно вызывается:

(i) повышенными уровнями эстрогена, что приводит к несбалансированному соотношению тестостерона и эстрогена;

(ii) антагонисты андрогенов или антиандрогены, используемые для лечения рака предстательной железы или ВРН. Эти лекарственные средства подавляют тестостерон, однако при подавлении тестостерона начинает повышаться эстроген.

Хотя в настоящее время оценивают ряд экспериментальных лекарственных средств, в настоящее время не существует одобренных способов лечения гинекомастии. Следовательно, гинекомастию лечат путем хирургического удаления ткани молочной железы. Наблюдение индуцируемой MOR10703 необратимой атрофии мужской молочной железы указывает на то, что оно может быть полезным для лечения гинекомастии.

Для дальнейшего исследования MOR10703 и других антител против HER3 в отношении лечения гинекомастии человека можно использовать модели гинекомастии на трансгенных мышах. Эти модели были разработаны путем экспрессии ароматазы человека в молочной железе мыши, и они повторяют многие аспекты гинекомастии у человека (Li et al., Endocrinology, 2002; 143:4074-4083; Tekmal et al., Cancer Res. 1996; 56:3180-318).

В одном варианте осуществления изобретение относится к лечению гинекомастии с использованием антител против HER3 или их фрагментов. MOR10703, и другие антитела против HER3 также можно исследовать в отношении лечения эндометриоза гинекологического состояния, при котором клетки выстилки матки (эндометрия) появляются и распространяются извне полости матки. Главным, но не универсальным симптомом эндометриоза является боль в области таза в различных проявлениях. Хотя основные причины эндометриоза не хорошо охарактеризованы, полагают, что он зависит от присутствия эстрогена. Поскольку MOR10703 индуцировало атрофию эндометрия у самок мышей, приводящую к снижению массы матки, его можно использовать для лечения эндометриоза. Для дальнейшего исследования эффектов MOR10703 и других антител против HER3 на эндометриоз эндометрий человека в пролиферативной фазе можно имплантировать в брюшную полость бестимусных мышей с нормальным циклом и овариэктомией или диабетических мышей без ожирения (NOD) с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) с циклом, и этих мышей SCID можно использовать в качестве моделей (Gummer et al., 2001. Human Reproduction; 16; 1736-1743).

Антитела против HER3 также можно использовать для лечения или профилактики других нарушений, ассоциированных с aberrантной или дефектной передачей сигнала HER, включающих, но не ограничивающихся ими, респираторные заболевания, остеопороз, остеоартрит, поликистоз почек, диабет, шизофрению, сосудистое заболевание, сердечное заболевание, неонкогенные пролиферативные заболевания, фиброз и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера.

Пригодные средства для комбинированного лечения связывающими HER3 антителами включают стандартные средства, известные в данной области, которые способны модулировать каскад передачи сигнала ErbB. Подходящие примеры стандартных средств в случае HER2 включают, но не ограничиваются ими, Негсертин и Тукерб. Подходящие примеры стандартных средств в случае EGFR включают, но не ограничиваются ими, Iressa, Tarceva, Erbitux и Vectibix. Другие средства, которые могут быть пригод-

ными для комбинированного лечения связывающими HER3 антителами, включают, но не ограничиваются ими, средства, которые модулируют рецепторные тирозинкиназы, сопряженные с G-белком рецепторы, каскады передачи сигнала для роста/выживания, ядерные рецепторы гормонов, апоптотические каскады, клеточный цикл и ангиогенез.

**Диагностические применения.**

В одном аспекте изобретение охватывает диагностические анализы для определения белка HER3 и/или экспрессии нуклеиновой кислоты, а также функции белка HER, в контексте биологического образца (например, крови, сыворотки, клеток, тканей), или у индивидуума, страдающего злокачественной опухолью или имеющего риск развития злокачественной опухоли.

Диагностические анализы, такие как конкурентные анализы, основаны на способности меченого аналога ("отслеживающего индикатора") конкурировать с анализируемым соединением в исследуемом образце за ограниченное количество участков связывания на общем связывающем партнере. Связывающий партнер, как правило, преобразуют в нерастворимый до или после конкуренции, а затем отслеживающий индикатор и анализируемое соединение, связанные со связывающим партнером, отделяют от несвязанного отслеживающего индикатора и анализируемого соединения. Это разделение проводят путем декантации (где связывающий партнер предварительно сделан нерастворимым) или путем центрифугирования (где связывающий партнер был осажден после конкурентной реакции). Количество анализируемого соединения в исследуемом образце обратно пропорционально количеству связанного отслеживающего индикатора при измерении по количеству маркерного вещества. Для количественного определения анализируемого соединения, присутствующего в исследуемом образце, строят кривые доза-ответ с известными количествами анализируемого соединения и сравнивают их с результатами исследования. Эти анализы называют системами ELISA, когда в качестве поддающихся обнаружению маркеров используют ферменты. В этой форме анализа конкурентное связывание между антителами и связывающими HER3 антителами приводит к связыванию белка HER3, предпочтительно эпитопов HER3 по изобретению, что является показателем содержания антител в образце сыворотке, наиболее конкретно, нейтрализующих антител в образце сыворотки.

Значительное преимущество этого анализа состоит в том, что прямо проводят измерение нейтрализующих антител (т.е. антител, которые препятствуют связыванию белка HER3, в частности эпитопов). Такой анализ, в частности в форме теста ELISA, имеет важные применения в клинических условиях и при повседневном скрининге крови.

Другой аспект изобретения относится к способам определения экспрессии нуклеиновой кислоты HER3 или активности белка HER3 у индивидуума, чтобы тем самым выбрать подходящие терапевтические или профилактические средства для этого индивидуума (называемым в настоящем описании "фармакогеномикой"). Фармакогеномика позволяет выбирать средства (например, лекарственные средства) для терапевтического или профилактического лечения индивидуума на основе генотипа этого индивидуума (например, генотип индивидуума, исследуемого для определения способности индивидуума отвечать на конкретное средство).

Другой аспект изобретения относится к мониторингу влияния средств (например, лекарственных средств) на экспрессию или активность белка HER3 в клинических испытаниях.

**Фармацевтические композиции.**

Для получения фармацевтических или стерильных композиций, включающих связывающие HER3 антитела (интактные или связывающие фрагменты), связывающие HER3 антитела (интактные или связывающие фрагменты) смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиции могут, кроме того, содержать одно или несколько других терапевтических средств, которые пригодны для лечения или профилактики злокачественной опухоли (рака молочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака легкого, множественной миеломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, остеосаркомы, плоскоклеточной карциномы, опухолей оболочки периферических нервов, шванномы, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака пищевода Барретта, глиобластомы, светлоклеточной карциномы мягкой ткани, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки, меланомы, рака предстательной железы, доброкачественной гиперплазии предстательной железы (BPH), гинекомастии и эндометриоза).

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать смешиванием с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

Выбор режима введения для терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость кругооборота соединения в сыворотке или тканях, уровень симптомов, иммуногенность соединения и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. В определенных вариантах осуществления режим введения максимизирует количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Таким образом, количество доставляемого биологического средства зависит от конкретного соединения и тяжести подвергаемого лечению состояния. Руководства по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и низкомолекулярных соединений являются доступными (см., например, Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert et al., (2003), *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al., (1999), *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al., (2001), *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniamunovitz et al., (2000), *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al., (2003), *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al., (2000), *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Определение соответствующей дозы проводит врач, например, с использованием параметров или факторов, о которых известно или предполагается в данной области, что они влияют на лечение, или для которых предсказано, что они влияют на лечение. Как правило, доза начинается с количества, немного меньшего, чем оптимальная доза, и после этого ее увеличивают с небольшими приращениями до тех пор, пока не достигают желательного или оптимального эффекта относительно каких-либо побочных эффектов. Важные диагностические показатели включают показатели симптомов, например, воспаления, или уровни продуцируемых воспалительных цитокинов.

Истинные уровни дозировок активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьировать так, чтобы обеспечить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не вызывая токсичности у пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие терапевтические средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и предшествующий медицинский анамнез подвергаемого лечению пациента, и сходных факторов, известных в области медицины.

Композиции, содержащие антитела или их фрагменты по изобретению, могут быть предоставлены путем непрерывной инфузии, или с помощью доз с интервалами, например, одни сутки, одна неделя или 1-7 раз в неделю. Дозы могут быть предоставлены внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, внутримозговым путем или путем ингаляции. Конкретный протокол доз представляет собой протокол, вовлекающий максимальную дозу или частоту доз, которая лишена существенных нежелательных побочных эффектов. Общая недельная доза может составлять по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы 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 et al., (2003), *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold et al., (2002), *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu et al., (1999), *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji et al., (2003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). Желательная доза антител или их фрагментов является примерно такой же, как и для антитела или полипептида в единицах моль/кг массы тела. Желательную концентрацию антител или их фрагментов в плазме выражают приблизительно в моль/кг массы тела. Доза может составлять по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 20 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 30 мкг, по меньшей мере 35 мкг, по меньшей мере 40 мкг, по меньшей мере 45 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 55 мкг, по меньшей мере 60 мкг, по меньшей мере 65 мкг, по меньшей мере 70 мкг, по меньшей мере 75 мкг, по меньшей мере 80 мкг, по меньшей мере 85 мкг, по меньшей мере 90 мкг, по меньшей мере 95 мкг или по меньшей мере 100 мкг. Количество доз, вводимых индивидууму, может составлять по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, или более.

Для антител или их фрагментов по изобретению дозировка, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 до 100 мг/кг массы тела пациента. Дозировка 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 массы тела пациента.

Дозировку антител или их фрагментов по изобретению можно вычислять с использованием массы пациента в кг, умноженной на дозу, подлежащую введению, в мг/кг. Дозировка антител или их фрагментов по изобретению 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 массы тела пациента или менее.

Единичная дозировка антител или их фрагментов по изобретению 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.

Дозировка антител или их фрагментов по изобретению может достигать титра в сыворотке по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 6 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 175 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 225 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 275 мкг/мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 325 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 375 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл у индивидуума. Альтернативно, дозировка антител или их фрагментов по изобретению может достигать титра в сыворотке по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 6 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 175 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 225 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 275 мкг/мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 325 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 375 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл у индивидуума.

Дозы антител или их фрагментов по изобретению могут быть повторяющимися, и введения могут быть разделены на по меньшей мере 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 5 суток, 10 суток, 15 суток, 30 суток, 45 суток, 2 месяца, 75 суток, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев.

Эффективное количество для конкретного пациента может варьировать, в зависимости от таких факторов, как подвергаемое лечению состояние, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard, et al. (1996), *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001), *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, Великобритания).

Путь введения может представлять собой, например, местное или чрескожное применение, инъекцию или инфузию внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримозговым, внутримышечным, внутриглазным, внутриартериальным, интрацереброспинальным, внутриочаговым путем или с помощью систем для замедленного высвобождения или имплантата (см., например, Sidman et al., (1983), *Biopolymers* 22:547-556; Langer et al., (1981), *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277; Langer, (1982), *Chem. Tech.* 12:98-105; Epstein et al., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; Hwang et al., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4034; патенты США № 6350466 и 6316024). Когда это необходимо, композиция также может включать солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в области инъекции. Кроме того, также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и состава со средством для аэролизации. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации РСТ № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Композицию по настоящему изобретению также можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения варьирует, в зависимости от желательных результатов. Выбираемые пути введения антител или их фрагментов по изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, позвоночный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение может обеспечивать пути введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, но не ограничивается ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутривнутрибрюшинную, чрестрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутривнутрипозвоночную, эпидуральную и внутривнутригрудную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композицию по изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как мест-

ный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты по изобретению вводят путем инфузии. В другом варианте осуществления полиспецифический связывающий эпитоп белок по изобретению вводят подкожно.

Если антитела или их фрагменты по изобретению вводят в системе с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, можно использовать насос для обеспечения контролируемого или замедленного высвобождения (см. Langer, выше; Sefton, (1987), *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., (1980), *Surgery* 88:507; Saudek et al., (1989), *N. Engl. J. Med.* 321:574). Для достижения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств по изобретению можно использовать полимерные материалы (см. например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen и Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas (1983) J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; также см. Levy et al. (1985), *Science*, 228:190; During et al. (1989), *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al. (1989), *J. Neurosurg.* 7 1:105; патенты США № 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; публикации PCT № WO 99/15154 и WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в составах с замедленным высвобождением, включают, но не ограничиваются ими, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимеры лактидов и гликолидов (PLGA) и сложные полиортоэфиры. В одном варианте осуществления полимер, используемый в составе с замедленным высвобождением, является инертным, свободным от вымываемых примесей, стабильным при хранении, стерильным и биоразлагаемым. Систему для контролируемого или замедленного высвобождения можно помещать вблизи профилактической или терапевтической мишени, таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, p. 115-138 (1984)).

Системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer ((1990), *Science* 249:1527-1533). Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько антител или их фрагментов по изобретению, можно использовать любой способ, известный специалисту в данной области. См., например, патент США № 4526938, публикации PCT WO 91/05548, WO 96/20698, Ning et al., (1996), *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., (1995), *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek et al., (1997), *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, и Lam et al., (1997), *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Если антитела или их фрагменты по изобретению вводят местно, их можно составлять в форме мази, крема, чрескожного пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или в другой форме, хорошо известной специалисту в данной области. См., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Для нераспыляемых дозированных форм для местного применения используют формы от вязких до полутвердых или твердые формы, содержащие носитель или один или несколько эксципиентов, совместимых с местным применением и имеющих динамическую вязкость, в некоторых случаях, превышающую динамическую вязкость воды. Пригодные составы включают, но не ограничиваются ими, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, линименты, бальзамы и т.п., которые, если желательно, являются стерилизованными или смешанными со вспомогательными веществами (например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими веществами, буферами или солями) для влияния на различных свойства, например, такие как осмотическое давление. Другие пригодные местные дозированные формы включают распыляемые аэрозольные препараты, где активный ингредиент, в некоторых случаях в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упакован в смеси с находящимся под давлением летучим веществом (например, газообразным пропеллентом, таким как фреон) или в гибкой бутылке. Также в фармацевтические композиции и дозированные формы, если желательно, можно добавлять увлажнители или смачивающие вещества. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в данной области.

Если композиции, содержащие антитела или их фрагменты, вводят интраназально, они могут быть составлены в форме аэрозоля, спрея, влажной пыли или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства для применения в соответствии с настоящим изобретением можно удобным образом доставлять в форме аэрозольного спрея из пакетов под давлением или небулайзера с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ). В случае аэрозоля под давлением единичная дозировка может определяться с помощью предоставления клапана для доставки отмеренного количества. Можно составлять капсулы и кассеты (состоящие, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Способы совместного введения или лечения со вторым терапевтическим средством, например цитокином, стероидом, химиотерапевтическим средством, антибиотиком или радиоактивным средством, известны в данной области (см., например, Hardman et al., (eds.) (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole и Peterson (eds.) (2001), Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner и Longo (eds.) (2001), Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может уменьшить симптомы на по меньшей мере 10%; по меньшей мере 20%; по меньшей мере приблизительно 30%; по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%.

Дополнительные терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые можно вводить в комбинации с антителами или их фрагментами по изобретению, можно вводить с интервалом менее 5 мин, менее 30 мин, 1 ч, приблизительно 1 ч, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, от приблизительно 11 до приблизительно 12 ч, приблизительно от 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 относительно введения антител или их фрагментов по изобретению. Два или более терапевтических средства можно вводить за один визит пациента.

Антитела или их фрагменты по изобретению и другие терапевтические средства можно вводить курсами. Курсовая терапия вовлекает введение первого терапевтического средства (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени, а затем введение второго терапевтического средства (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени, необязательно, с последующим введением третьего терапевтического средства (например, профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени и т.д., и повторение этого последовательного введения, т.е. цикла для снижения развития устойчивости к одному из терапевтических средств, или чтобы избежать или снизить побочные эффекты одного из терапевтических средств и/или чтобы повысить эффективность терапевтических средств.

В определенных вариантах осуществления антитела или их фрагменты по изобретению можно составлять для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) исключает применение многих высокогидрофильных соединений. Для обеспечения того, чтобы терапевтические соединения по изобретению проходили через ГЭБ (если это желательно), их можно составлять, например, в липосомах. Для способов изготовления липосом, см., например, патенты США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько частей, которые селективно транспортируют в определенные клетки или органы, таким образом, усиливая направленную доставку лекарственных средств (см., например, Ranade, (1989), J. Clin. Pharmacol. 29:685). Иллюстративные части для нацеливания включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016, Low et al); маннозиды (Umezawa et al., (1988), Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитела (Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995), Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); рецептор белка А сурфактанта (Briscoe et al., (1995), Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al, (1994), J. Biol. Chem. 269:9090); также см. K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994), FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994), Immunomethods, 4:273.

Изобретение относится к протоколам для введения фармацевтической композиции, содержащей антитела или их фрагменты по изобретению, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами индивидууму, нуждающемуся в этом. Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии по настоящему изобретению можно вводить индивидууму одновременно или последовательно. Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии по настоящему изобретению также можно вводить курсами. Курсовая терапия вовлекает введение первого терапевтического средства (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени, а затем введение второго терапевтического средства (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени и повторение этого последовательного введения, т.е. курса, чтобы снизить развитие устойчивости к одному из терапевтических средств (например, агентов), чтобы избежать или снизить побочные эффекты одного из терапевтических средств (например, агентов) и/или чтобы увеличить эффективность терапевтических средств.

Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии по изобретению можно вводить индивидууму одновременно. Термин "одновременно" не ограничивается введением терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств) точно в одно и то же время, а скорее он подразумевает, что фармацевтическую композицию, содержащую антитела или их фрагменты по изобретению, вводят индивидууму последовательно и



в пределах временного интервала, так чтобы антитела по изобретению могли действовать совместно с другим терапевтическим средством(ами) для обеспечения увеличенной пользы относительно того, как если бы их вводили иным образом. Например, каждое терапевтическое средство можно вводить индивидууму в то же время или последовательно в любом порядке в любые моменты времени; однако, если их вводят не одновременно, их следует вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить желательный терапевтический или профилактический эффект. Каждую терапию можно проводить индивидууму отдельно в любой подходящей форме и любым пригодным путем. В различных вариантах осуществления терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) вводят индивидууму с интервалом менее 15 мин, менее 30 мин, менее 1 ч, приблизительно 1 ч, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, от приблизительно 11 до приблизительно 12, 24, 48, 72 ч или 1 неделя. В других вариантах осуществления два или более терапевтических средства (например, профилактических или терапевтических средства) вводят за один и тот же визит пациента.

Профилактические или терапевтические средства комбинированной терапии можно вводить индивидууму в одной и той же фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические средства комбинированной терапии можно вводить индивидууму одновременно в отдельных фармацевтических композициях. Профилактические или терапевтические средства можно вводить индивидууму теми же или отличающимися путями введения.

После полного описания изобретения оно далее иллюстрируется следующими примерами и формулой изобретения, которые являются иллюстративными и не предназначены для дальнейшего ограничения.

### Примеры

Пример 1. Способы, материалы и скрининг антител.

(i) Клеточные линии.

Клеточные линии ВХРС-3, SK-Bv-3, BT-474, MDA-MB-453, FaDu и MCF-7 приобретали от ATCC и стандартным образом поддерживали в среде для роста, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS).

(ii) Получение рекомбинантных векторов HER3 человека, яванского макака, мыши и крысы.

Внеклеточный домен HER3 мыши амплифицировали способом ПЦР из кДНК головного мозга мыши (Clontech) и последовательность подтверждали путем сравнения с Refseq NM\_010153. ECD HER3 крысы подвергали обратной транскрипции с мРНК клеток Rat-2, последовательность подтверждали путем сравнения с NM\_017218. кДНК-матрицу для HER3 яванского макака получали с использованием РНК из различных тканей яванского макака (Zyagen Laboratories) и продукт ОТ-ПЦР клонировали в PCR®-ТОРО-XL (Invitrogen) перед секвенированием обеих цепей. HER3 человека происходил из библиотеки кДНК головного мозга эмбриона человека (Source), и последовательность подтверждали путем сравнения с NM\_001982.

Для получения меченых рекомбинантных белков, HER3 человека, мыши, крысы и яванского макака амплифицировали способом ПЦР с использованием Taq-полимеразы Pwo (Roche Diagnostics). Амплифицированные продукты ПЦР очищали из геля и клонировали в исходный вектор gateway pDonR201 (Invitrogen), который ранее был модифицирован включением в рамку считывания N-концевой лидерной последовательности CD33 и C-концевой метки, например FLAG-метки. Метка позволяет очистку мономерных белков с помощью моноклонального антитела против метки. Гены-мишени были фланкированы AttB1 и AttB2, обеспечивающими рекомбинацию в адаптированные запатентованные конечные векторы Gateway (например, pcDNA3.1) с использованием технологии клонирования Gateway® (Invitrogen). Реакции рекомбинации проводили с использованием реакции Gateway LR с запатентованными конечными векторами, содержащими промотор CMV, с получением экспрессирующих метку векторов, хотя можно использовать любой коммерчески доступный вектор.

Кроме того, получали рекомбинантные белки HER3, которые были слиты с ECD HER3 выше C-концевого участка расщепления фактором X и шарнирной областью IgG и Fc-доменом человека с получением меченого Fc белка. Для осуществления этого ECD HER3 амплифицировали способом ПЦР и клонировали в вектор (например, pcDNA3.1), модифицированный так, чтобы он содержал в рамке считывания слитую с C-концом конструкцию участка фактора X-шарнирная область-hFc. Полученная открытая рамка считывания была фланкирована участками AttB1 и AttB2 для дальнейшего клонирования с помощью рекомбинантной технологии клонирования Gateway® (Invitrogen). Реакцию LR Gateway использовали для переноса HER3-Fc в конечную экспрессирующую конструкцию, содержащую промотор CMV. Экспрессирующие конструкции с точковой мутацией HER3 получали с использованием протоколов сайт-направленного мутагенеза и последовательности полученных векторов подтверждали.

Таблица 8

Получение экспрессирующих векторов HER3.  
 Нумерация аминокислот HER3 основана на NP 001973 (человек),  
 NP 034283 (мышь) и NP 058914 (крыса)

Название	Описание
Hu HER3	CD33-[HER3 человека, остатки 20-640]-метка
Mu HER3	CD33-[HER3 мыши, остатки 20-643]-метка
Rat HER3	CD33-[HER3 крысы, остатки 20-643]-метка
Cyno HER3	CD33-[HER3 яванского макака, остатки 20-643]-метка
HER3 D1-2	CD33-[HER3 человека, остатки 20-329]-метка
HER3 D2	CD33-[HER3 человека, остатки 185-329]-метка
HER3 D3-4	CD33-[HER3 человека, остатки 330-643]-метка
HER3 D4	CD33-[HER3 человека, остатки 496-643]-метка
Hu HER3-Fc	[HER3 человека, остатки 1-643]-Fc
Mu HER3-Fc	[HER3 мыши, остатки 1-643]-Fc
Cyno HER3-Fc	[HER3 яванского макака, остатки 1-643]-Fc
Rat HER3-Fc	[HER3 крысы, остатки 1-643]-Fc
HER3 D2-Fc	[HER3 человека, остатки 207-329]-Fc
HER3 K267A	CD33-[HER3 человека, остатки 20-640, K267A]-метка
HER3 L268A	CD33-[HER3 человека, остатки 20-640, L268A]-метка
HER3 K267A/L268A	CD33-[HER3 человека, остатки 20-640, K267A/L268A]-метка

(iii) Экспрессия рекомбинантных белков HER3.

Желательные рекомбинантные белки HER3 экспрессировали в происходящих из HEK293 клеточных линиях, заранее адаптированных к суспензионной культуре и выращенных в запатентованной бесывороточной среде Novartis. Подтверждение мелкомасштабной экспрессии проводили в анализах с временной трансфекцией в планшетах с 6 ячейками на основе липофекции. Крупномасштабную продукцию белка посредством временной трансфекции проводили в масштабе 10-20 л в биореакторной системе Wave™ (Wave Biotech). Полиэтилениминовую ДНК (Polysciences) использовали в качестве носителя для плазмиды в соотношении 1:3 (мас.:мас.). Супернатанты клеточной культуры собирали через 7-10 суток после трансфекции и концентрировали посредством фильтрации в перекрестном потоке и диафильтрации перед очисткой.

(iv) Очистка меченого белка.

Рекомбинантные меченые белки HER3 (например, метка-HER3) очищали посредством сбора супернатанта клеточной культуры и концентрирования в 10 раз посредством фильтрации в перекрестном потоке с фильтром с порогом 10 кДа (Fresenius). Колонку с антителом против метки приготавливали путем связывания моноклонального антитела против метки с активированной посредством CNBr Sepharose 4B в конечном соотношении 10 мг антитела на мл смолы. Концентрированный супернатант наносили на 35-мл колонку с антителом против метки со скоростью потока 1-2 мл/мин. После первоначального промывания PBS, связавшийся материал элюировали с помощью 100 мМ глицина (pH 2,7), нейтрализовывали и подвергали стерильной фильтрации. Концентрации белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм и преобразования с использованием теоретического фактора 0,66 AU/мг. Очищенный белок окончательно охарактеризовывали посредством SDS-PAGE, N-концевого секвенирования и LC-MS.

(v) Очистка Fc-метки.

Концентрированный супернатант клеточной культуры наносили на 50-мл колонку Fast Flow с Sepharose с белком А при скорости потока 1 мл/мин. После первоначального промывания PBS колонку промывали 10 объемами колонки 10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/30% (об./об.) изопропанол, pH 7,3, а затем 5 объемами колонки PBS. Наконец, связавшийся материал элюировали смесью 50 мМ цитрат/140 мМ NaCl (pH 2,7),

нейтрализовывали и подвергали стерильной фильтрации.

(vi) Получение сверхэкспрессирующих клеточных линий.

Для получения клеточной линии, которая экспрессирует высокие уровни HER3 на клеточной поверхности, конструировали экспрессирующий вектор млекопитающих, содержащий вставку, кодирующую лидерную последовательность CD33 выше аминокислотных остатков 20-667 HER3 человека, слитую в рамке считывания с аминокислотными остатками 669-1210 EGFR человека. При экспрессии в клетках млекопитающих полученный химерный белок содержит N-концевой внеклеточный и трансмембранный домен HER3 и C-концевой цитоплазматический домен EGFR. Вектор HER3/1 трансфицировали в клетки CHO-S (Invitrogen) и после селекции с антибиотиками получали стабильные объединенные фракции. Полученная клеточная линия (CHO HER3/1) экспрессировала высокие уровни внеклеточного домена HER3 на ее клеточной поверхности.

(vii) Пэннинг с HuCAL GOLD®.

Для отбора антител, распознающих HER3 человека, применяли несколько стратегий пэннинга. Терапевтические антитела против белка HER3 человека получали путем селекции клонов, имеющих высокую аффинность связывания, с использованием в качестве источника вариантов белков антитела коммерчески доступной библиотеки фагового дисплея, библиотеки MorphoSys HuCAL GOLD®. Фагмидная библиотека основана на идее HuCAL® (Knappik et al., (2000), J. Mol. Biol. 296:57-86), и в ней используется технология CysDisplay® для дисплея Fab на поверхности фага (WO01/05950, Lohning).

Для выделения антител против HER3 выполняли стандартные стратегии пэннинга, а также RapMAT, с использованием твердофазных подходов пэннинга, подходов пэннинга в растворе, подходов пэннинга цельных клеток и дифференциального подхода пэннинга цельных клеток.

(viii) Твердофазный пэннинг.

Для идентификации антител против HER3 выполняли различные стратегии твердофазного пэннинга с использованием различных рекомбинантных белков HER3. Для проведения каждого раунда твердофазного пэннинга планшеты Maxisorp (Nunc) покрывали белком HER3. Меченые белки улавливали с использованием планшетов, предварительно либо покрытых антителом против Fc (антитело козы или мыши против IgG человека, Jackson Immuno Research), либо покрытых антителом против метки, либо посредством пассивной адсорбции. Покрытые планшеты промывали PBS и блокировали. Покрытые планшеты промывали два раза посредством PBS, а затем добавляли фаг HuCAL GOLD® с антителами в течение 2 ч при комнатной температуре на устройстве для встряхивания. Связавшиеся фаги элюировали, добавляли к E.coli TG-1 и инкубировали для инфицирования фагом. Затем инфицированные бактерии выделяли и высевали на планшеты с агаром. Колонии соскребали и фаги спасали и амплифицировали. Каждая стратегия пэннинга HER3 включала индивидуальные раунды пэннинга и включала уникальные антигены, концентрации антигенов и жесткость промывания.

(ix) Пэннинг в растворе

Каждый раунд пэннинга в растворе проводили с использованием различных биотинилированных рекомбинантных белков HER3 в присутствии или в отсутствие нейрорегулина 1-β1 (R&D Systems). Белки биотинилировали с использованием набора для биотинилирования EZ-link sulfo-NHS-LC biotinylation kit (Pierce) в соответствии с инструкциями изготовителя. 800 мкл связанных со стрептавидином магнитных гранул (Dynabeads, Dynal) промывали один раз PBS и блокировали в течение ночи посредством Chemiblocker (Chemicon). Фаги HuCAL GOLD® с антителами и соответствующие биотинилированные HER3 инкубировали в реакционной пробирке. Магнитные гранулы со стрептавидином добавляли в течение 20 мин и собирали с помощью сепаратора магнитных частиц (Dynal). Связанные фаги элюировали с Dynabeads посредством добавления в каждую пробирку буфера, содержащего DTT, и добавляли к E.coli TG-1. Инфицирование фагом проводили идентично тому, как описано для твердофазного пэннинга. Каждая стратегия пэннинга HER3 включала индивидуальные раунды пэннинга и включала уникальные антигены, концентрации антигенов и жесткость промывания.

(x) Пэннинг на клеточной основе.

Для клеточного пэннинга фаги HuCAL GOLD® с антителами инкубировали с приблизительно  $10^7$  клеток на устройстве для вращения в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем центрифугировали. Клеточный осадок выделяли и фаги элюировали из клеток. Супернатант собирали и добавляли в культуру E.coli TG-1, а затем продолжали процесс, описанный выше. Для идентификации антител против HER3 использовали две стратегии на клеточной основе:

а) пэннинг цельных клеток: в этой стратегии множество интактных клеточных линий использовали в качестве антигенов;

б) дифференциальный пэннинг цельных клеток: в этой стратегии антигены последовательно состояли из клеток и рекомбинантных белков HER3 (см. 1981.09 в качестве примера). Пэннинг на клеточной основе проводили, как описано выше, в то время как протоколы твердофазного пэннинга использовали, когда рекомбинантные белки использовали в качестве антигенов. Промывания проводили с использованием PBS (2-3×) и PBST (2-3×).

(xi) Получение библиотеки RapMAT™ и пэннинг.

Для повышения аффинности связывания антител при сохранении разнообразия библиотеки продукт второго раунда пэннинга как в растворе, так и в твердой фазе, подвергали процессу RapMAT™, в то время как получали продукт третьего раунда стратегий пэннинга цельных клеток и дифференциального пэннинга цельных клеток (Prassler et al., (2009), *Immunotherapy*; 1:571-583). Библиотеки RapMAT™ получали путем субклонирования кодирующих Fab вставок фагов, выбранных посредством пэннинга, в вектор фагового дисплея pMORPH®25\_bla\_LHC и далее расщепляли для получения либо библиотек H-CDR2 RapMAT™, либо библиотек L-CDR3 RapMAT™ с использованием определенных ферментов рестрикции. Вставки заменяли на кассеты для созревания TRIM (Virnekas et al., (1994), *Nucleic Acids Research* 22:5600-5607) для H-CDR2 или L-CDR3 в соответствии с композицией совокупного продукта. Было оценено, что размеры библиотек находились в диапазоне  $8 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  клонов. Фаг с антителом RapMAT получали и подвергали двум дальнейшим раундам пэннинга в растворе, твердой фазе или на клеточной основе с использованием экспериментальных способов, описанных ранее.

Пример 2. Временная экспрессия IgG против HER3.

Адаптированные к суспензии клетки HEK293-6E культивировали в BioWave20 до плотности приблизительно  $2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Клетки временно трансфицировали соответствующей стерильной смесью ДНК:PEI и далее культивировали. Через семь суток после трансфекции клетки извлекали фильтрацией в перекрестном потоке с использованием фильтров Fresenius (0,2 мкм). Бесклеточный материал концентрировали с помощью фильтрации в перекрестном потоке с использованием фильтра с пороговым значением 10 кДа (Fresenius), и концентрат подвергали стерильной фильтрации через фильтр steriscip (0,22 мкм). Стерильный супернатант хранили при 4°C.

Пример 3. Очистка IgG против HER3.

Очистку IgG проводили на хроматографической системе АКТА 100 explorer Air при 6°C в помещении с охлаждением с использованием колонки XK16/20 с 25 мл самоуплотняющейся смолы MabSelect SuRe (все от GE Healthcare). Все скорости потока составляли 3,5 мл/мин, за исключением загрузки, с пределом давления 5 бар. Колонку уравнивали 3 объемами колонки PBS перед загрузкой фильтрованного супернатанта ферментации при 2,0 мл/мин. Колонку промывали 8 объемами колонки PBS. IgG элюировали с помощью градиента pH, начиная с 50 мМ цитрата/70 мМ NaCl (pH 4,5), линейно снижаясь в 12 объемах колонки до 50 мМ цитрата/70 мМ NaCl (pH 2,5), с последующей постоянной стадией с 2 объемами колонки с тем же буфером с pH 2,5. Содержащие IgG фракции объединяли, и сразу нейтрализовывали, и подвергали стерильной фильтрации (Millipore Steriflip, 0,22 мкм). Измеряли OD<sub>280</sub> и концентрацию белка вычисляли, исходя из данных о последовательности. Объединенные фракции по отдельности исследовали в отношении агрегации (SEC-MALS) и чистоты (SDS-PAGE и MS).

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

Экспрессию Fab-фрагментов, кодируемых pMORPH®X9\_Fab\_MH в клетках TG-1, проводили в культурах во вращающихся флаконах с использованием 500 мл 2× среды YT, дополненной 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры встряхивали при 30°C до тех пор, пока не достигали OD 600 нм, равной 0,5. Экспрессию индуцировали добавлением 0,75 мМ IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в течение 20 ч при 30°C. Клетки разрушали с использованием лизоцима. Меченные His6 Fab-фрагменты выделяли с помощью IMAC (Bio-Rad). Замену буфера на 1× PBS Дульбекко (pH 7,2) проводили с использованием колонок PD10. Образцы подвергали стерилизации фильтрованием (0,2 мкм). Концентрацию белка определяли с помощью УФ-спектрофотометрии. Чистоту образцов анализировали в денатурирующем восстанавливающем 15% SDS-PAGE. Гомогенность препаратов Fab определяли в нативном состоянии посредством эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) с калибровочными стандартами.

Пример 5. Измерение аффинности антитела против HER3 (K<sub>D</sub>) с помощью равновесного титрования в растворе (SET).

Определение аффинности в растворе в основном проводили, как описано в литературе (Friguet et al., (1985), *J. Immunol. Methods* 77:305-319). Для повышения чувствительности и точности способа SET его переключали с классического ELISA на технологию на основе ECL (Haenel et al., (2005), *Anal. Biochem.* 339:182-184).

Для определения аффинности с помощью SET использовали немеченный HER3-метка (человека, крысы, мыши или яванского макака), описанный ранее.

Данные оценивали с помощью программного обеспечения XLfit (ID Business Solutions) с использованием специально разработанных моделей аппроксимации. Для определения K<sub>D</sub> каждого IgG использовали следующую модель (модифицированную в соответствии с Piehler et al (Piehler et al., (1997), *J. Immunol. Methods*, 201:189-206):

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

где [IgG]: используемая общая концентрация IgG;

x: используемая общая концентрация растворимого антигена (участки связывания);

$B_{\max}$ : максимальный сигнал IgG без антигена;

$K_D$ : аффинность.

Пример 6. Определение связывание антитела с клетками с помощью FACS.

Связывание антител с эндогенным антигеном человека, экспрессированным на злокачественных клетках человека, оценивали с помощью FACS. Для определения величин  $EC_{50}$  антитела, клетки SK-Bv-3 собирали с помощью аккутазы и разбавляли до  $1 \times 10^6$  клеток/мл в буфере для FACS (PBS/3% FBS/0,2%  $NaN_3$ ).  $1 \times 10^5$  клеток/лунка добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) и центрифугировали при  $210 \times g$  в течение 5 мин при  $4^\circ C$  перед удалением супернатанта. К осажденным клеткам добавляли серийные разведения исследуемых антител (разбавленные с шагом разведения 1:4 с помощью буфера для FACS) и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки промывали и осаждали три раза с помощью 100 мкл буфера для FACS. К клеткам добавляли конъюгированное с PE антитело козы против IgG человека (Jackson ImmunoResearch), разбавленное 1/200 буфером для FACS, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Дополнительные стадии промывания проводили три раза с помощью 100 мкл буфера для FACS, а затем проводили стадии центрифугирования при  $210 \times g$  в течение 5 мин при  $4^\circ C$ . Наконец, клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS и величины флуоресценции измеряли с помощью FACSAria (BD Biosciences). Количество связанного с клеточной поверхностью антитела против HER3 оценивали путем измерения средней флуоресценции канала.

Пример 7. Связывание домена HER3 и его мутанта.

96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc) покрывали в течение ночи при  $4^\circ C$  200 нг соответствующего рекомбинантного белка человека (HEK3-метка, D1-2-метка, D2-метка, D3-4-метка, D4-метка, HER3 K267A-метка, HER3 L268A-метка, HER3 K267A/L268A и меченый несоответствующий контроль). Затем все лунки промывали три раза PBS/0,1% Tween-20, блокировали в течение 1 ч PBS/1% BSA/0,1% Tween-20 и промывали три раза PBS/0,1% Tween-20. В соответствующие лунки добавляли антитела против HER3 до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты промывали три раза PBS/0,1% Tween-20, а затем добавляли соответствующее связанное с пероксидазой антитело для обнаружения, разбавленное 1/10000 в PBS/1% BSA/0,1% Tween-20. Используемые антитела для обнаружения представляли собой антитело козы против антител мыши (Pierce, 31432), антитело кролика против антител козы (Pierce, 31402) и антитело козы против антител человека (Pierce, 31412). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем промывали три раза PBS/0,1% Tween-20. Во все лунки добавляли 100 мкл раствора субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (BioFxx) на 6 мин, а затем реакцию останавливали 50 мкл 2,5%  $H_2SO_4$ . Степень связывания антитела против HER3 с каждым рекомбинантным белком определяли путем измерения  $OD_{450}$  с использованием устройства для считывания планшетов SpectraMax (Molecular Devices). Когда это целесообразно, кривые доза-ответ анализировали с использованием Graphpad Prism.

Пример 8. Картирование эпитопа HER3 с использованием масс-спектрометрии на основе водородно-дейтериевого обмена.

Материалы.

Буфер  $D_2O$  получали путем растворения 25 mM TBS (pH 7,5)/500 mM NaCl в тяжелой воде (Sigma). Восстанавливающий раствор представлял собой 50 mM формиатный буфер (pH 4), 500 mM TCEP, и раствор для гашения представлял собой 0,5% (об/об) трифторуксусную кислоту (TFA) в воде. Буфер А представлял собой 0,25% муравьиную кислоту/10% метанол/10% этиленгликоль в воде, и буфер В представлял собой 0,25% муравьиную кислоту в ацетонитриле. Все химические реагенты приобретали от Sigma и растворители категории ВЭЖХ были от Fisher Scientific.

Обработка жидкостей и хроматография.

Эксперименты с автоматической масс-спектрометрией на основе водородно-дейтериевого обмена (HDX MS) разрабатывали на основе способов и оборудования, описанных Wales et al., (2006) Anal. Chem. 78:1005-1014). В кратком изложении, для всех действий по обработке жидкостей использовали устройство для обработки жидкостей Pal HTS (LEAP Technologies), содержащееся в охлаждаемом объеме, поддерживаемом при  $2^\circ C$ . Инъекционный клапан с 6 отверстиями и блок для промывания были помещены на рельсы устройства для обработки жидкостей, и они облегчали инъекцию в хроматографическую систему и промывание шприцом.

Хроматографическая система состояла из дополнительного клапана с 10 отверстиями,  $2,1 \times 30$  мм колонки с пепсином Poroszyme (Applied Biosystems), обращенно-фазовой кассеты Cap Trap  $0,5 \times 2$  мм

(Michrom Bioresources) и самоуплотненного электрораспылительного излучателя в качестве аналитической колонки (100 мкм × ~60 мм, Kinetex 2,6 мкм C18, Phenomenex). Головку клапана с 10 отверстиями, кассету для улавливания и аналитическую колонку содержали в отдельном корпусе, сконструированном из алюминия и поддерживали при -5°C с помощью стоп Пельтье. Клапаны и колонки были организованы так, чтобы позволить параллельное расщепление белка, обессоливание пептида и обращенно-фазовую хроматографию перед введением образца в источник электрораспылительной ионизации (ESI) масс-спектрометра LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific).

Жидкостные потоки, требуемые для функционирования, обеспечивались двумя отдельными насосами ВЭЖХ. Первый насос ВЭЖХ (насос Surveyor MS, Thermo Scientific) доставлял буфер А при постоянной скорости потока 125 мкл/мин, и его использовали для переноса образца через кассету с иммобилизованным пепсином на кассету обращенно-фазовой ловушки, установленную напротив клапана с 10 отверстиями. После загрузки и периода обессоливания, клапан с 10 отверстиями переключали для элюирования образца с помощью градиентного насоса (AQUITY UPLC, Waters) из кассеты с обращенно-фазовой ловушкой через аналитическую колонку и источник ионов масс-спектрометра. Кассету с иммобилизованным ферментом отделяли для выбрасывания в процессе градиентного элюирования. Градиентный насос доставлял линейные градиентные сегменты подвижной фазы В от 0 до 40% в течение 35 мин при 5 мкл/мин и подвижной фазы В от 40 до 95% при 5 мкл/мин в течение 10 мин. Градиентный поток из насоса разделялся в клапане с 10 отверстиями с использованием пассивного разделителя, так чтобы истинный поток через кассету для улавливания и аналитическую колонку для градиентного элюирования составлял ~1 мкл/мин. Весь хроматографический пробег имел длительность 70 мин, включая стадии промывания и уравнивания.

#### Масс-спектрометрия.

Для идентификации протеолитических фрагментов, полученных при параллельном расщеплении, проводили несколько зависящих от данных экспериментов MS/MS. Для получения этих данных получали спектры тандемной MS с помощью анализатора LTQ гибридного масс-спектрометра LTQ-Orbitrap. Выбор предшествующих масс был основан на изображениях MS, полученных с помощью анализатора Orbitrap. Одностадийное получение данных MS, проведенной для определения уровня дейтерирования, осуществляли при разрешении 60000 с помощью анализатора Orbitrap (при m/z 400-2000).

#### Получение белка и комплексов белок:Fab.

Белок HER3 получали разбавлением 50 мкг НЕК3-метки посредством 25 mM TBS (pH 7,5)/500 mM NaCl до конечного объема 50 мкл. Комплексы белок:Fab получали путем смешения 50 мкг HER3-метки в молярном соотношении 1:1 с исследуемым Fab. Затем смеси белок:Fab разбавляли до конечного объема 50 мкл посредством 25 mM TBS (pH 7,5)/500 mM NaCl.

Получали комплексы белок:Fab и позволяли им инкубироваться в течение по меньшей мере 2 ч при 4°C. Четыре 96-луночных планшета, содержащих образец, разбавитель, раствор для гашения и восстанавливающий раствор, загружали в устройство для обработки жидкости перед началом каждого эксперимента. Для экспериментов по обмену 50 мкл HER3 или комплекса HER3:Fab разбавляли 150 мкл буфера D<sub>2</sub>O. Смесь восстанавливали добавлением 200 мкл восстанавливающего буфера в течение 1 мин, а затем гасили 600 мкл буфера для гашения. Общий объем после всех стадий обработки жидкости составлял ~1 мл. После смешивания раствор для гашения инжектировали в хроматографическую систему, где он автоматически расщеплялся, разделялся и анализировался с помощью LCMS. Среднее изменение дейтерирования между образцом и контролем вычисляли в качестве разности между уровнями захвата дейтериями в образце и контроле.

#### Обработка данных.

Файлы RAW Orbitrap конвертировали в файлы mzXML с использованием внутренней программы (RawXtract). Затем проводили поиск среди данных тандемной MS с использованием SEQUEST (Yates Lab, Scripps Research Institute, La Jolla, CA) и результаты поиска автоматически фильтровали с использованием DTASelect 2.0 (Yates Lab, Scripps Research Institute, La Jolla, CA). С использованием идентифицированных пептидных последовательностей собственную программу использовали для автоматического извлечения хроматограмм единичных ионов для каждой идентифицированной последовательности и получения средних спектров для хроматографического пика. Средние спектры сглаживали и центрировали. Уровень захвата дейтерия принимали в качестве разности масс между дейтерированным образцом и недейтерированным эталоном. Обработанные данные вручную подтверждали и корректировали для исправления неточностей и ошибок стадий автоматической обработки. Уровни захвата дейтерия приписывали каждому остатку белковой последовательности путем делокализации содержания дейтерия для каждого пептида (т.е. деления наблюдаемого уровня дейтерирования на количество аминокислот в этом пептиде). Если остаток охватывался более чем одним пептидом, нормализованный захват дейтерия всех пептидов, охватывающих этот остаток, усредняли.

Пример 9. Определение рентгеновской кристаллической структуры комплексов HER3 человека/Fab MOR09823 и ER3 человека/Fab MOR09825.

В настоящем примере представлена кристаллическая структура полноразмерного HER3, связанного с Fab-фрагментом MOR09823 и Fab-фрагментом MOR09825, определенная при разрешении 3,2 и 3,4 Å соответственно. Меченый HER3 человека далее очищали на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 Prep-Grade (GE Healthcare), уравновешенной в PBS (pH 7,3). E.coli, экспрессировавшие Fab MOR09823 и MOR09825, выделяли путем лизиса клеток лизоцимом и His<sub>6</sub>-меченные Fab-фрагменты улавливали на колонке HisTrap\_HP (GE Healthcare). Fab-фрагменты MOR09823 далее очищали гель-фильтрационной хроматографией с использованием колонки Superdex 75 16/60 (GE Healthcare), уравновешенной в 25 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl.

Комплексы HER3-Fab получали путем смешения избытка Fab с меченым HER3 в молярных соотношениях 1,3-1,8:1 (концентрация, оцененная по поглощению при 280 нм с использованием вычисленных коэффициентов экстинкции 0,9 и 1,4 (мг/мл)<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> для HER3 и Fab соответственно) и очистки комплексов на колонке Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), уравновешенной в 25 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl. Фракции пиков анализировали посредством SDS-PAGE и LCMS. Для каждого комплекса фракции, содержащие как HER3, так и Fab приблизительно в эквимольном соотношении, объединяли и концентрировали. Кристаллы HER3/MOR09823 выращивали при 293K способом диффузии пара с сидячей каплей, включающим 150 нл комплекса HER3/MOR09823 и 150 нл резервуарного раствора (100 mM цитрат натрия pH 5,6, 20% PEG 4000 и 20% изопропанол). Кристаллы переносили в резервуарный раствор, содержащий дополнительный 8% глицерин, и быстро охлаждали в жидком азоте. Кристаллы HER3/MOR09825 выращивали при температуре 293 K способом диффузии пара с сидячей каплей, включающим 150 нл комплекса HER3/MOR09825 и 150 нл резервуарного раствора (100 mM bis-tris pH 6,5, 16% PEG 10000). Кристаллы переносили в 100 mM bis-tris pH 6,5, 18% PEG 10000 и 22% глицерин и быстро охлаждали в жидком азоте.

Данные собирали с помощью линии пучка 17-ID в Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory). Данные о комплексе HER3/Fab MOR09823 обрабатывали и масштабировали при 3,2 Å с использованием HKL2000 (HKL Research Inc) в пространственной группе I222 с размерами ячейки a=124,16, b=139,44, c=180,25 Å, с хорошими статистическими результатами. Структуру HER3/Fab MOR09823 решали с помощью молекулярного вытеснения с использованием Phaser (McCoy et al., (2007), J. Appl. Cryst. 40:658-674) с фрагментами Fab и опубликованной структурой ECD HER3 1mb6 в качестве моделей для поиска. Конечную модель, которая содержит одну молекулу комплекса HER3/Fab MOR09823 на асимметричный элемент, конструировали в COOT (Emsley & Cowtan (2004), Acta Cryst. 60:2126-2132) и уточняли до величин R и R<sub>free</sub> 19,0 и 24,5% соответственно, с rmsd 0,010 Å и 1,37° для длины связи и углов связи соответственно, с использованием BUSTER (Global Phasing, LTD). Остатки HER3, которые содержат атомы в пределах 5 Å от любого атома в Fab MOR09823, как идентифицировано в PyMOL (Schrodinger, LLC), приведены в табл. 11 и 12. Данные о комплексе HER3/Fab MOR09825 обрабатывали и масштабировали при 3,4 Å с использованием autoPROC (Global Phasing, LTD) в пространственной группе I222 с размерами ячейки a=124,23, b=140,94, c=180,25 Å, с хорошими статистическими результатами. Структуру HER3/Fab MOR09825 решали с помощью молекулярного вытеснения с использованием Phaser (McCoy et al., (2007), J. Appl. Cryst. 40:658-674) со структурой HER3/Fab MOR09823 в качестве модели для поиска. Конечную модель, которая содержит одну молекулу комплекса HER3/Fab MOR09825 на асимметричный элемент, конструировали в COOT (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. 60:2126-2132) и уточняли до величин R и R<sub>free</sub> 18,8 и 24,9% соответственно, с rmsd 0,009 Å и 1,21° для длины связи и углов связи соответственно, с использованием BUSTER (Global Phasing, LTD). Остатки HER3, которые содержат атомы в пределах 5 Å от любого атома в Fab MOR09825, как идентифицировано в PyMOL (Schrodinger, LLC), приведены в табл. 13 и 14.

Пример 10. Клеточные анализы фосфо-HER3 in vitro.

Клетки MCF-7 стандартным образом поддерживали в DMEM/F12, 15 mM HEPES, L-глутамине, 10% FCS и клетки SK-Br-3 поддерживали в McCoys 5a, 10% FCS, 1,5 mM L-глутамине. Практически смыкающиеся монослои клеток MCF7 или SK-Br-3, выращенных в полной среде, собирали с помощью аккутазы (PAA Laboratories) и ресуспендировали в подходящей среде для роста в конечной концентрации 5×10<sup>5</sup> клеток/мл. Затем 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном (Nunc) до конечной плотности 5×10<sup>4</sup> клеток/лунка. Клеткам MCF7 позволяли прикрепляться в течение приблизительно 3 ч, а затем среду заменяли на среду для голодания, содержащую 0,5% FBS. Затем все планшеты инкубировали в течение ночи 37°C, а затем обрабатывали соответствующей концентрацией антител против HER3 (разбавленных в соответствующих средах) в течение 80 мин при 37°C. Клетки MCF7 обрабатывали 50 нг/мл домена EGF нейрорегулина 1-β1 (R&D Systems) в течение последних 20 мин для стимуляции фосфорилирования HER3. Все среды осторожно аспирировали и клетки промывали ледяным PBS, содержащим 1 mM CaCl<sub>2</sub> и 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco). Клетки лизировали добавлением 50 мкл ледяного буфера для лизиса (20 mM Tris (pH 8,0)/137 mM NaCl/10% глицерин/2 mM EDTA/1% NP-40/1 mM ортованадат натрия/апротинин (10 мкг/мл)/лейпептин (10 мкг/мл)) и инкубировали

ли на льду при встряхивании в течение 30 мин. Затем лизаты собирали и центрифугировали при  $1800 \times g$  в течение 15 мин при  $4^\circ C$  для удаления клеточного дебриса. 20 мкл лизата добавляли в предварительно приготовленный планшет для улавливания.

Планшеты для улавливания HER3 получали с использованием углеродного планшета (Mesoscale Discovery), который покрывали в течение ночи при  $4^\circ C$  посредством 20 мкл антитела для улавливания MAB3481 (R&D Systems) в концентрации 4 мкг/мл, разбавленного в PBS, а затем блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином в  $1 \times$  буфере Tris (Mesoscale Discovery)/0,1% Tween-20. HER3 улавливали из лизата посредством инкубации планшета при комнатной температуре в течение 1 ч при встряхивании, а затем лизат аспирировали и лунки промывали  $1 \times$  буфером Tris (Mesoscale Discovery)/0,1% Tween-20. Обнаружение фосфорилированного HER3 проводили с использованием 0,75 мкг/мл биотинилированного антитела против фосфотирозина (R&D Systems), приготовленного в 1% BSA/ $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20 посредством инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки промывали четыре раза посредством  $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20 и обнаружение биотинилированных белков проводили посредством инкубации с меченым S-Tag стрептавидином (Mesoscale Discovery), разбавленным в 1% BSA/ $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Каждую лунку аспирировали и промывали четыре раза  $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20, а затем добавляли 20 мкл буфера для считывания T с поверхностно-активным веществом (Mesoscale Discovery) и сигнал количественно определяли с использованием устройства для визуализации Mesoscale Sector Imager. Антитела MOR06391 или MOR03207 включили в эксперименты по передаче сигнала в качестве изотипических контролей.

Пример 11. Клеточные анализы фосфо-Akt (S473) *in vitro*.

Практически смыкающиеся монослои клеток SK-Br-3 и BT-474, выращенные в полных средах, собирали с помощью аккутазы (PAA Laboratories) и ресуспендировали в соответствующих условиях роста в конечной концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Затем 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном (Nunc) до конечной плотности  $5 \times 10^4$  клеток/лунка. Затем все планшеты инкубировали в течение ночи при  $37^\circ C$ , а затем обрабатывали соответствующей концентрацией антител против HER3 (разбавленных в соответствующих средах) в течение 80 мин при  $37^\circ C$ . Все среды осторожно аспирировали и клетки промывали ледяным PBS, содержащим 1 mM  $CaCl_2$  и 0,5 mM  $MgCl_2$  (Gibco). Клетки лизировали добавлением 50 мкл ледяного буфера для лизиса (20 mM Tris (pH 8,0)/137 mM NaCl/10% глицерин/2 mM EDTA/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  $1800 \times g$  в течение 15 мин при  $4^\circ C$  для удаления клеточного дебриса. 20 мкл лизата добавляли в 384-луночный углеродный планшет multi-spot с фосфо-Akt (Mesoscale Discovery), который предварительно был заблокирован 3% BSA/ $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании, а затем лизат аспирировали и лунки промывали четыре раза  $1 \times$  буфером Tris (Mesoscale Discovery)/0,1% Tween-20. Обнаружение фосфорилированного Akt проводили с использованием 20 мкл антитела против фосфо-Akt с SULFO-TAG (S473) (Mesoscale Discovery), разбавленного в 50 раз в 1% BSA/ $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20, путем инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 2 ч. Лунки промывали четыре раза посредством  $1 \times$  Tris/0,1% Tween-20, а затем добавляли 20 мкл буфера для считывания T с поверхностно-активным веществом (Mesoscale Discovery) и сигнал количественно определяли с использованием устройства для визуализации Mesoscale Sector Imager. Антитела MOR06391 или MOR03207 включили в эксперименты по передаче сигнала в качестве изотипических контролей.

Пример 12. Анализы пролиферации клеточных линий.

Клетки SK-Br-3 стандартным образом культивировали в модифицированной среде McCoy 5A, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой, и клетки BT-474 культивировали в DMEM, дополненной 10% FBS. Практически смыкающийся монослой клеток трипсинизировали, промывали PBS, добавляли до  $5 \times 10^4$  клеток/мл средой для роста и высевали в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном (Costar 3904) при плотности 5000 клеток/лунка. Клетки инкубировали в течение ночи при  $37^\circ C$ , а затем добавляли соответствующую концентрацию антитела против HER3 (типичные конечные концентрации 10 или 1 мкг/мл). Планшеты возвращали в инкубатор на 6 суток, а затем проводили оценку жизнеспособности клеток с использованием CellTiter-Glo (Promega). 100 мкл раствора CellTiter-Glo добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре при осторожном встряхивании в течение 10 мин. Величину люминесценции определяли с использованием устройства для считывания планшетов SpectraMax (Molecular Devices). Степень ингибирования роста, полученную с помощью каждого антитела, вычисляли путем сравнения величин люминесценции, полученных для каждого антитела против HER3, со стандартным изотипическим контрольным антителом (MOR06391).

Для анализов пролиферации клетки MCF-7 стандартным образом культивировали в DMEM/F12 (1:1), содержащей 4 mM L-глутамин/15 mM HEPES/10% FBS. Практически смыкающийся монослой клеток трипсинизировали, промывали PBS и разбавляли до  $1 \times 10^5$  клеток/мл посредством DMEM/F12 (1:1), содержащей 4 mM L-глутамин/15 mM HEPES/10 мкг/мл трансферрина человека/0,2% BSA. Клетки высевали



вали в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном (Costar) при плотности 5000 клеток/лунка. Затем добавляли антитело против HER3 в соответствующей концентрации (типичные конечные концентрации 10 или 1 мкг/мл). Также добавляли 10 нг/мл домена EGF NRG1- $\beta$ 1 (R&D Systems) в соответствующие лунки для стимуляции роста клеток. Планшеты возвращали в инкубатор на 6 суток, а затем оценивали жизнеспособность клеток с использованием CellTiter-Glo (Promega). Степень ингибирования роста, полученную для каждого антитела, получали путем вычитания фоновых (без нейрорегулина) величин люминесценции и сравнения полученных величин для каждого антитела против HER3 со стандартным изотипическим контрольным антителом (MOR06391).

Пример 13. Клеточные анализы блокирования лиганда.

Клетки MCF-7, культивированные в MEM, дополненной 10% FBS и 1 мкг/мл инсулина (Sigma), промывали и собирали в небольшой объем буфера для диссоциации клеток FACSmax (Genlantis), а затем добавляли 5 мл буфера для FACS (PBS/1% FBS/0,1% азид натрия). Плотность клеток подсчитывали и доводили до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл. 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и клетки осаждали центрифугированием (220 г, 3 мин, 4°C). Клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл соответствующих исследуемых антител, разбавленных в буфере для FACS (типичные конечные концентрации антитела находились в диапазоне от 100 до 0,1 нМ), и планшет инкубировали на льду в течение 45 мин. Блокирующее лиганд антитело MAB3481 (R&D Systems) включали в качестве положительного контроля. Клетки промывали два раза буфером для окрашивания, а затем добавляли 10 нМ домен EGF NRG1- $\beta$ 1 (R&D Systems), разбавленный в буфере для FACS, и инкубировали на льду в течение 45 мин. Клетки промывали два раза буфером для окрашивания и обнаружение связавшегося нейрорегулина проводили посредством инкубации клеток с 10 нМ антителом против домена EGF NRG1- $\beta$ 1 человека (R&D Systems) на льду в течение 45 мин. Клетки промывали два раза буфером для окрашивания и инкубировали на льду в течение 45 мин со связанным с PE антителом против антител козы (Jackson ImmunoResearch), разбавленным 1/500 буфером для FACS. Затем клетки осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS. Для количественного определения каждого образца 10000 живых клеток подсчитывали на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences) и количество связанного с клеточной поверхностью нейрорегулина оценивали путем измерения средней флуоресценции канала.

Пример 14. Биохимический анализ блокирования лиганда.

Настоящий способ включает применимость биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore™ GE Healthcare, Uppsala, Швеция) для исследования способности комплексов HER3/антитело связывать нейрорегулин.

В Biacore™ используется явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для обнаружения и измерения связывающих взаимодействий. В типичном эксперименте Biacore одну из взаимодействующих молекул (нейрорегулин) иммобилизируют на матрицу, в то время как партнера по взаимодействию (HER3) пропускают над поверхностью. Связывающее взаимодействие приводит к увеличению массы на поверхности сенсора и соответствующее прямое изменение индекса рефракции среды вблизи поверхности сенсора. Изменения индекса рефракции регистрируют в резонансных единицах (R.U.). Мониторинг изменений сигнала вследствие ассоциации и диссоциации комплексов проводят неинвазивным образом, постоянно и в реальном времени, и его результаты представляют в форме сенсограммы.

Для проведения всех экспериментов, описанных в настоящем документе, использовали Biacore™ T100 (GE Healthcare, Uppsala, Швеция). Подготовку сенсорной поверхности и анализа взаимодействия проводили при 25°C. Буфер и реагенты для Biacore приобретали от GE Healthcare. На протяжении анализа использовали подвижный буфер, содержащий 10 mM Hepes, pH 7,4/150 mM NaCl, 0,05% P20, 0,5% BSA.

Внеклеточный домен NRG-1 $\beta$ 1 (R&D Systems) инкубировали на льду в течение 45 мин с EZ-link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) в молярном соотношении 5:1. Реакционную смесь гасили добавлением избытка этаноламина и не связавшийся биотин удаляли из биотинилированного NRG с использованием обессоливающих центрифужных колонок (Zeba). Биотинилированный NRG иммобилизовывали на сенсорном чипе CAP, на который было предварительно иммобилизовано приблизительно 3000 R.U. оцДНК-стрептавидина (Biotin CAPture kit) до поверхностной плотности нейрорегулина в диапазоне 400-600 R.U. Эталонную проточную ячейку получали, не включая биотинилированный NRG в стадии инъекции, так чтобы только оцДНК-стрептавидин присутствовал на поверхности проточной ячейки.

Комплексы HER3/антитело получали путем инкубации 10 нМ HER3-Fc человека с возрастающими концентрациями (0-50 нМ) соответствующего исследуемого антитела в течение 15 мин при комнатной температуре перед инкубацией в Biacore™ при 10°C. Анализы взаимодействия проводили путем инъекции комплексов HER3/антитело над эталонной поверхностью и поверхностью с нейрорегулином партиями в течение 180 с при скорости потока 60 мкл/мин. Мониторинг диссоциации комплекса проводили в течение 180 с при скорости потока 60 мкл/мин. Регенерацию поверхности проводили в конце каждого цикла анализа с использованием инъекции в течение 120 с 8 M гуанидина: 1 M NaOH (3:1) с последующей инъекцией в течение 120 с 30% ацетонитрила/0,25 M NaOH при скорости потока 30 мкл/мин.

Пример 15. Исследования PD *in vivo*.

Клетки VxPC3 и BT-474 культивировали и имплантировали самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (Harlan Laboratories), как описано в примерах 16 и 17.

После достижения опухолями соответствующего размера животных исследовали в отношении качества опухоли. Животных с опухолями, с изъязвленными опухолями или животных с заполненными жидкостью опухолями исключали из исследования. Остальным животным внутривенно вводили антитело посредством инъекции в боковую хвостовую вену. В данные моменты времени животных умерщвляли посредством асфиксии с CO<sub>2</sub> и проводили взятие цельной крови посредством пункции сердца и помещали ее в 1,5-мл пробирку для сбора Eppendorf. Опухолевую ткань сразу разрезали, помещали в полипропиленовую пробирку для образца с навинчивающейся крышкой и быстро замораживали в жидком азоте. Ткань хранили при -80°C до приготовления лизатов.

Пример 16. Исследования эффективности в BT-474 *in vivo*.

Клетки BT-474 культивировали в DMEM, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку без антибиотиков, до момента имплантации.

За одни сутки до инокуляции клеток самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (Harlan Laboratories) подкожно имплантировали гранулы с 17β-эстрадиолом с непрерывным высвобождением (Innovative Research of America) для поддержания уровня эстрогена в сыворотке. Через одни сутки после имплантации гранул с 17β-эстрадиолом 5×10<sup>6</sup> клеток инъецировали ортотопно в жировое тело 4-й молочной железы в суспензии, содержащей 50% матригел без фенолового красного (BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составил 200 мкл. Через 20 суток после имплантации клеток животных с объемом опухоли приблизительно 200 мм<sup>3</sup> включали в исследование эффективности. Как правило, в исследование эффективности включали всего 10 животных на группу.

Для исследований одного средства животным внутривенно дозировали путем инъекции через латеральную хвостовую вену или MOR10701 или MOR10703. В качестве первой дозы вводили первоначальную нагрузочную дозу 40 мг/кг. После первоначальной дозы животным проводили введение по схеме 20 мг/кг, раз в двое суток, на протяжении исследования. Для комбинированных исследований животным вводили либо MOR10701, либо MOR10703 (20 мг/кг, в/в, q2d) и субоптимальную дозу трастузумаба (1 мг/кг, в/в, 2qw).

В течение исследований объем опухоли измеряли с помощью толщиномера два раза в неделю. Процентные величины обработка/контроль (Т/С) вычисляли с использованием следующей формулы:

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

где Т = средний объем опухоли в группе с введением лекарственного средства на последние сутки исследования;

ΔТ = средний объем опухоли в группе введения лекарственного средства на последние сутки введения - средний объем опухоли в группе введения лекарственного средства на первые сутки дозирования;

С = средний объем опухоли в контрольной группе на последние сутки исследования;

ΔС = средний объем опухоли в контрольной группе на последние сутки введения - средний объем опухоли в контрольной группе на первые сутки дозирования.

Массу тела измеряли два раза в неделю и дозу корректировали в зависимости от массы тела. % изменение массы тела (BW) вычисляли как (BW<sub>текущая</sub> - BW<sub>исходная</sub>) / (BW<sub>исходная</sub>) × 100. Данные представлены в качестве процентного изменения массы тела относительно суток начала лечения.

Все данные выражали в качестве среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения (SEM). Для статистического анализа использовали разницу объемов опухоли и массы тела. Сравнения между группами проводили с использованием одностороннего ANOVA с последующим апостериорным критерием Тьюки. Для всех статистических оценок уровень значимости был установлен на p < 0,05. Представлена значимость по сравнению с контрольной группой носителя.

Пример 17. Исследования эффективности в VxPC3 *in vivo*.

Клетки VxPC3 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку без антибиотиков, до времени имплантации.

Самкам бестимусных мышей nu/nu Balb/C (Harlan Laboratories) подкожно имплантировали 10×10<sup>6</sup> клеток в смеси 50% фосфатно-солевого буфера с 50% матригелем. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл. После достижения опухолями размера приблизительно 200 мм<sup>3</sup> животных включали в исследование эффективности. Как правило, в исследование включали всего 10 животных на группу. Животных исключали из исследования, если они проявляли необычные характеристики роста опухоли перед включением.

Животным дозу вводили посредством внутривенного введения путем инъекции в латеральную хвостовую вену. В качестве первой дозы вводили первоначальную нагрузочную дозу 40 мг/кг. После первоначальной дозы животным проводили введение по схеме 20 мг/кг, раз в двое суток, на протяжении исследования (введение в течение 25 суток). Объем опухоли и величины Т/С вычисляли, как подробно описано выше.

Пример 18. Анализы PD с фосфо-Akt (S473) *in vivo*.

Замороженную опухолевую ткань (например, BT-474 или VХРС-3) размером приблизительно 50 мм<sup>3</sup> размораживали на льду и к каждому образцу добавляли 100-300 мкл буфера T-PER (Pierce), содержащего фосфатазу (Roche) и ингибиторы протеазы (Roche). Объем добавленного лизирующего буфера зависел от размера образца опухоли. Ткань разрушали с использованием 1,5-мл пестика (Fisher Scientific) и полученные суспензии инкубировали на льду в течение 15 мин, а затем замораживали в течение ночи при -8 °С. Образцы размораживали и центрифугировали в течение 15 мин при 13000×g, 4°С, а затем проводили количественное определение концентрации белка в супернатанте с помощью анализа BCA (Thermo Scientific). Супернатанты ткани разбавляли лизирующим буфером (Mesoscale Discovery) и 25 мкг добавляли в 96-луночный углеродный планшет в фосфо-Akt Multi-spot (Mesoscale Discovery), который предварительно блокировали блокирующим раствором А (Mesoscale Discovery). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при встряхивании, а затем лизат аспирировали и лунки промывали четыре раза буфером для промывания Tris (Mesoscale Discovery). Обнаружение фосфорилированного Akt проводили с использованием 25 мкл антитела против фосфо-Akt с SULFO-TAG (S473) (Mesoscale Discovery), разбавленного в буфере для разведения антитела, посредством инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки промывали четыре раза буфером для промывания Tris, а затем добавляли 150 мкл буфера для считывания Т (с поверхностно-активным веществом) (Mesoscale Discovery) и сигнал количественно определяли с использованием устройства для визуализации Mesoscale Sector Imager.

Пример 19. Анализы PD с фосфо-HER3 (Y1197) *in vivo*.

Замороженную опухолевую ткань (например, VХРС-3) размером приблизительно 50 мм<sup>3</sup> размораживали на льду и к каждому образцу добавляли 100-300 мкл буфера T-PER (Pierce), содержащего фосфатазу (Roche) и ингибиторы протеазы (Roche). Ткань разрушали с использованием 1,5-мл пестика (Fisher Scientific) и полученные суспензии инкубировали на льду в течение 15 мин, а затем замораживали в течение ночи при -80°С. Образцы размораживали и центрифугировали в течение 15 мин при 13000×g, 4°С, а затем проводили количественное определение концентрации белка в супернатанте с помощью анализа BCA (Thermo Scientific). Супернатанты ткани разбавляли лизирующим буфером, и 150 мкг добавляли в 96-луночный углеродный планшет в фосфо-Akt Multi-spot (Mesoscale Discovery), который предварительно покрывали в течение ночи посредством 4 мкг/мл МАВ3481 (R&D Systems) и блокировали 3% молоком. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании, а затем лизат аспирировали и лунки промывали четыре раза буфером для промывания Tris (Mesoscale Discovery). Фосфорилированный HER3 связывали с использованием антитела против HER3 pY1197, разбавленного 1/8000 блокирующим буфером. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч лунки промывали буфером для промывания Tris и проводили выявление антитела против pY1197 с использованием меченого S-Tag антитела против антител кролика (Mesoscale Discovery), разбавленного 1/1000 в блокирующем буфере, путем инкубации при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки промывали четыре раза буфером для промывания Tris, а затем добавляли 150 мкл разбавленного 1/4 буфера для считывания Т (с поверхностно-активным веществом) (Mesoscale Discovery) и сигнал количественно определяли с использованием устройства для визуализации Mesoscale Sector Imager.

Пример 20. Исследования комбинирования лекарственных средств *in vitro*.

Для оценки возможности комбинирования нацеленных на HER3 антител с направленной терапией, MOR09825 или MOR10703 комбинировали с трастузумабом, лапатинибом, BEZ235, ВКМ120, BYL719, RAD001, эрлотинибом и цетуксимабом в анализах жизнеспособности клеток. Приблизительно 1000-1500 клеток SK-Br-3 (McCoу), MDA-MB-453 (RPMI), FaDu (EMEM) или L3,3 (RPMI) высевали в 384-луночные планшеты в подходящей культуральной среде, дополненной 2% FBS, и позволяли им прикрепляться в течение ночи при 37°С. Затем в лунки добавляли соответствующие комбинации лекарственных средств (типичные конечные концентрации лекарственного средства для лапатиниба, ВКМ120 и BYL719 находились в диапазоне от 3 мкМ до 13 нМ; для RAD001 они находились в диапазоне от 27 до 0,0041 нМ; для эрлотиниба они находились в диапазоне от 1 мкМ до 0,0025 нМ; для MOR1073 они находились в диапазоне от 100 до 0,01 нМ; для цетуксимаба они находились в диапазоне от 100 до 0,0015 нМ; и для трастузумаба они находились в диапазоне от 300 до 0,046 нМ), последовательно добавляли в лунки, так чтобы каждый планшет включал кривую доза-ответ для каждого лекарственного средства в двумерной матрице. Планшеты возвращали в инкубатор на 3-6 суток, а затем проводили оценку жизнеспособности клеток с использованием CellTiter-Glo (Promega). В каждую лунку добавляли раствор CellTiter-Glo и инкубировали при комнатной температуре при осторожном встряхивании в течение 10 мин. Величину люминесценции определяли с использованием устройства для считывания планшетов SpectraMax (Molecular Devices). Степень ингибирования роста, полученную для каждой комбинации, вычисляли и активность комбинирования определяли с использованием модели аддитивности Loewe.

Пример 21. Исследования комбинаций лекарственных средств *in vivo* в клетках L3.3.

Клетки поджелудочной железы L3.3 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку до времени имплантации. Самкам мышей Foxnl

nude (Harlan Laboratories) подкожно имплантировали  $3 \times 10^6$  клеток в свободной от FBS DMEM. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 100 мкл. Через 12 суток после имплантации клеток, животных включали в исследование эффективности со средним объемом опухоли приблизительно 100 мм<sup>3</sup> для всех групп. Как правило, в исследования включали всего 8 животных на группу. Животных исключали из исследования, если они проявляли необычные характеристики роста опухоли перед включением в исследование.

Животным внутривенно вводили MOR10703 посредством инъекции в боковую хвостовую вену по схеме 20 мг/кг, раз в двое суток, на протяжении исследования (введение в течение 14 суток). Эрлотиниб вводили по схеме 50 мг/кг (п/о) каждые сутки либо в качестве единственного средства, либо в комбинации с MOR10703. Объем опухоли и величины Т/С вычисляли, как подробно описано ранее.

Результаты и обсуждение.

В совокупности, эти результаты демонстрируют, что класс антител связывается с аминокислотными остатками в домене 2 и домене 4 конформационного эпитопа HER3 и стабилизирует HER3 в неактивной или закрытой конформации. Связывание этих антител ингибирует как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала. Эти антитела также способны одновременно связываться с лигандом HER3.

(i) Определение аффинности.

Аффинность антитела определяли посредством равновесного титрования в растворе (SET), как описано выше. Результаты обобщенно представлены в табл. 9, и иллюстративные кривые титрования для MOR10701 представлены на фиг. 1. Данные указывают на то, что был идентифицирован ряд антител, которые прочно связываются с HER3 человека, яванского макака, крысы и мыши.

Таблица 9

Величины  $K_D$  для IgG против HER3 при определении посредством равновесного титрования в растворе (SET). Hu (человек), Cy (яванский макак), Mu (мышь) и Ra (крыса), n.d (не определено)

MOR#	SET $K_D$ (nM)			
	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  $EC_{50}$  для клеток SK-Bv-3.

Способность идентифицированных антител связывать экспрессирующие HER3 клетки определяли путем вычисления величин  $EC_{50}$  в отношении их связывания с клеточной линией SK-Bv-3 с амплифицированным HER2 (см. фиг. 2 и табл. 10).

Таблица 10

Величины EC<sub>50</sub> в FACS для IgG против HER3  
на клетках SK-Br-3, n.d. (не определено)

MOR#	SK-Br-3 FACS EC <sub>50</sub> (nM)
09823	630
09824	324
09825	839
09974	n.d.
10701	n.d.
10702	n.d.
10703	2454

(iii) Связывание домена HER3.

Подгруппу антител против HER3 охарактеризовывали в отношении их способности связывать различные внеклеточные домены HER3 человека в анализе ELISA. Для осуществления этого внеклеточный домен HER3 подразделяли на его четыре конститутивных домена и различные комбинации этих доменов клонировали, экспрессировали и очищали в качестве независимых белков, как описано выше. С использованием этой стратегии следующие домены успешно получали в качестве растворимых белков: домены 1 и 2 (D1-2), домен 2 (D2), домены 3 и 4 (D3-4) и домен 4 (D4). Также исследовали ряд собственных полученных антител мыши против HER3 человека (8D7, 1F5 и 8P2) в качестве положительных контролей, чтобы продемонстрировать целостность каждого выделенного домена.

Как показано на фиг. 3, было выявлено, что как MOR09823, так и MOR09825 успешно связывают внеклеточный домен HER3, но в этом анализе с этими антителами наблюдали низкое связывание с выделенными доменами. Существует несколько возможных объяснений этого профиля связывания:

a) MOR09823 и MOR09825 могут связывать линейный эпитоп, который охватывает границу доменов, таким образом, часть связывающего эпитопа могла утрачиваться, когда домены экспрессировались в качестве выделенных белков;

b) MOR09823 и MOR09825 могут связывать нелинейный эпитоп, который соединяет множество доменов. Следовательно, разделение HER3 на его составляющие элементы может разрушить участок связывания;

c) форма/конформация HER3 может быть компонентом связывания MOR09823 и MOR09825 с HER3, так что только полноразмерный внеклеточный домен HER3 способен принимать эту форму/конформацию, в то время как выделенные домены не могут полностью принимать эту конформацию.

(iv) Картирование эпитопа HER3 с использованием масс-спектрометрии на основе водородно/дейтериевого обмена.

Эпитоп HER3 далее исследовали с помощью анализа HDX-MS ECD HER3 в присутствии и в отсутствии вариантов Fab MOR09823, MOR09824, MOR09825 и MOR09974. На фиг. 4A показано, что в отсутствие связанного Fab приблизительно 69% последовательности ECD HER3 охватывалось по меньшей мере одним пептидом. Пропуски охвата могут быть следствием гликозилирования остатков в этих областях или недостаточного восстановления дисульфидных связей в богатых цистеином областях, что особенно заметно в домене 2. Интересно, что хотя каждый Fab обеспечивал индивидуальные профили защиты, одну область высокой защиты постоянно наблюдали для MOR09823, MOR09824, MOR09825 и MOR09974 (см. фиг. 4B), что указывает на то, что эти высокородственные семейства антител связывают HER3 идентичным образом. Наиболее высокую защиту наблюдали для остатков 269-286 домена 2 (TFQLEPNPHTKYQYGGVC) (SEQ ID NO: 146), что указывает на то, что остатки вблизи них могут быть важными для связывания mAb. Картирование защищенных остатков Fab на опубликованной кристаллической структуре HER3 (Cho & Leahy, (2002), Science, 297:1330-1333) указывает на то, что остатки 269-286 находятся в пределах и вблизи функционально важной петли β-шпильки в домене 2 (см. фиг. 4C).

(v) Кристаллическая структура HER3/MOR09823.

Рентгеновская кристаллическая структура Fab-фрагмента MOR09823, связанного с внеклеточным доменом HER3, с разрешением 3,2 Å решали для дальнейшего определения эпитопа HER3, который распознается этим семейством родственных антител (см. фиг. 5A). Кроме того, решали структуру Fab-фрагмента MOR09825, связанного с HER3 человека, с разрешением 3,4 Å. Как в кристаллической структуре MOR09823/HER3, так и в кристаллической структуре MOR09825/HER3, HER3 находится в ограниченной (неактивной) конформации (см. фиг. 5A-D). Эта конформация характеризуется значительной поверхностью взаимодействия между доменами 2 и 4, опосредуемой петлей димеризации в виде β-шпильки в домене 2. Наблюдаемая конформация HER3 является сходной с конформацией, ранее описанной Cho et

al. (Cho & Leahy, (2002), *Science*, 297:1330-1333), которые опубликовали кристаллическую структуру внеклеточного домена HER3 в отсутствие нейрорегулина. Поскольку нейрорегулин может активировать HER3, ограниченная конформация HER3 предположительно является неактивной. Сходные ограниченные конформации также наблюдали, когда кристаллизовали родственные представители семейства EGFR HER4 (Bouyain et al., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:15024-15029) и HER1 (Ferguson et al., (2003), *Molec. Cell* 11:507-517).

Пространственная взаимосвязь между доменами 1-4 HER3 в неактивном (ограниченном состоянии) значительно отличается от вытянутого (активного) состояния. Это открытие основано на кристаллических структурах родственных представителей семейства EGFR HER2 и лигандсвязанного HER1 (Cho et al., (2003), *Nature*, 421:756-760; Ogiso et al., (2002), *Cell* 110:775-787; Garrett et al., (2002), *Cell* 110:763-773), оба из которых имеют вытянутое (активное) состояние. В вытянутом состоянии петля димеризации домена 2 в виде  $\beta$ -шпильки освобождается от ее ингибиторного взаимодействия с 4 и, таким образом, является свободной для взаимодействия с ее белками-партнерами по димеризации. Таким образом, петля димеризации домена 2 в виде  $\beta$ -шпильки является функционально важной как для поддержания ограниченного (неактивного) состояния, так и для опосредования димеризации рецепторов EGF в вытянутом состоянии, что приводит к активации внутриклеточного киназного домена. Кристаллические структуры MOR09823/HER3 и MOR09825/HER3 (см. фиг. 5), таким образом, указывают на то, что как MOR09823, так и MOR09825 функционируют путем стабилизации неактивной конформации HER3.

Кристаллическая структура также показала, что эпитоп HER3, распознаваемый как MOR09823, так и MOR09825, представляет собой нелинейный эпитоп, который включает остатки как из домена 2, так из домена и 4 (см. фиг. 5C и D, табл. 11-14). Эпитоп HER3, распознаваемый этим семейством высокородственных антител, таким образом, может быть определен как:

домен 2: остатки 265-277, 315;

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

Следовательно, связывание как домена 2, так и домена 4 посредством MOR09823 или MOR09825 может стабилизировать ограниченную конформацию HER3, таким образом осуществляя антагонизм его способности передавать сигнал.

Способ связывания MOR09823/MOR09825, наблюдаемый в кристаллической структуре, согласуется с другими исследованиями авторов настоящего изобретения по картированию эпитопа. В частности, эксперименты ELISA по связыванию домена демонстрируют, что аффинность MOR09823 и MOR09825 является значительно более высокой в отношении интактного внеклеточного белка HER3, чем в отношении его выделенных доменов (например, фрагментов D1, D1-D2, D3 или D3-D4) (см. фиг. 3). Также существует согласованность с данными HDX-MS для HER3 (см. фиг. 4B), которые идентифицируют  $\beta$ -шпильку домена 2 в качестве части распознаваемого антителом эпитопа. Наконец, обе кристаллические структуры указывают на то, что поверхность связывания HER3 с лигандом, которая картирована по аналогии с HER1 в доменах 1 и 3 (Ogiso et al., (2002), *Cell*, 110:775-787; Garrett et al., (2002), *Cell*, 110:763-773), не закрывается ни при связывании MOR09823, ни при связывании MOR09825 (см. фиг. 5B). Это согласуется с данными авторов настоящего изобретения, что ни MOR09823, ни MOR09825 не блокируют связывание нейрорегулина с клетками MCF7 (см. фиг. 9) и что комплексы HER3/MOR09823 могут связываться с иммобилизованным нейрорегулином в исследованиях *biacore* (см. фиг. 10).

Таблица 11

Взаимодействия между тяжелой цепью Fab MOR09823 и HER3 человека. Остатки VH Fab пронумерованы на основе их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 15). Остатки HER3 пронумерованы на основе NP 001973. Представленные остатки HER3 имеют по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab MOR09823

Fab MOR09823			HER3 человека		
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

## 036739

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 HER3 человека. Остатки VL Fab пронумерованы на основе их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 14). Остатки HER3 пронумерованы на основе NP 001973. Представленные остатки HER3 имеют по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab MOR09823

Fab MOR09823			HER3 человека		
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 HER3 человека. Остатки VH Fab пронумерованы на основе их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 51). Остатки HER3 пронумерованы на основе NP 001973. Представленные остатки HER3 имеют по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab MOR09825

Fab MOR09825			HER3 человека		
Остаток	Номер	Цепь	Остаток	Номер	Домен
Ser	30	VH	Asn	315	2
Ser	31	VH	Pro	274	2
			Pro	276	2

## 036739

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
			Gln	271	2
Asn	74	VH	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 HER3 человека. Остатки VL Fab пронумерованы на основе их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 50). Остатки HER3 пронумерованы на основе NP 001973. Представленные остатки HER3 имеют по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab MOR09825

Fab MOR09825			HER3 человека		
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

Визуальное исследование кристаллических структур MOR09823/MOR09825 показало, что остатки Lys267 и Leu268 HER3 формировали множественные взаимодействия с различными CDR антитела, что указывает на то, что они могут быть важны для связывания антитела. Следовательно, в Lys267 и/или Leu268 вносили мутации на аланин, экспрессировали и полученные рекомбинантные белки очищали для оценки их влияния на связывание антитела. Анализы связывания ELISA показали, что мутация либо Lys267, либо Leu268 устраняла связывание MOR10703 с HER3 (фиг. 5E), что указывает на то, что оба остатка являются целой частью эпитопа HER3 и, таким образом, подтверждают предполагаемые взаимодействия между MOR09823/MOR09825 и HER3.

(vi) Ингибирование клеточной передачи сигнала.

Для установления эффекта антител против HER3 в отношении лиганд-зависимой активности HER3, клетки MCF7 инкубировали с IgG перед стимуляцией нейрорегулином. Иллюстративные кривые ингибирования проиллюстрированы на фиг. 6A и обобщенно представлены в табл. 15. Эффект антител против HER3 на опосредуемую HER2 активацию HER3 также исследовали с использованием клеточной линии SK-Br-3 с амплифицированным HER2 (фиг. 6B и табл. 15).

Таблица 15

IC<sub>50</sub> pHER3 и величины степени ингибирования IgG против HER3 в клетках MCF7 и SK-Br-3

MOR#	MCF7 pHER3		SK-Br-3 pHER3	
	IC <sub>50</sub> (пМ)	% ингибирование	IC <sub>50</sub> (пМ)	% ингибирование
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 определения того, влияет ли ингибирование активности HER3 на последующую передачу сигнала в клетке, фосфорилирование Akt также измеряли в клетках с амплифицированным HER2 после обработки антителами против HER3 (см. фиг. 7 и табл. 16).

Таблица 16

IC<sub>50</sub> pAkt (S<sup>473</sup>) и величины степени ингибирования IgG против HER3 в клетках SK-Br-3, BT-474 и MCF7

MOR#	SK-Br-3 pAkt		BT-474 pAkt	MCF7 pAkt	
	IC <sub>50</sub> (пМ)	% ингибирование	% ингибирование	IC <sub>50</sub> (пМ)	% ингибирование
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 общем каждое из MOR09823, MOR09824, MOR09825, MOR09974, MOR10701, MOR10702, MOR10703, MOR12609 и MOR12610 способно ингибировать клеточную активность HER3 как лиганд-зависимым, так и лиганд-независимым образом.

(vii) Ингибирование пролиферации.

Поскольку все из MOR09823, MOR09824, MOR09825, MOR09974, MOR10701, MOR10702 и MOR10703 ингибировали активность HER3 и последующую передачу сигнала, их исследовали в отношении их способности блокировать лиганд-зависимый и лиганд-независимый рост клеток *in vitro* (Иллюстративные данные представлены на Фиг. 8 и обобщенно представлены в табл. 17). Все из исследованных антител против HER3 были эффективными ингибиторами пролиферации клеток.

Таблица 17

Ингибирование пролиферации после обработки 10 мкг/мл IgG против HER3 в клетках SK-Br-3, BT-474 и MCF7

MOR#	% ингибирование		
	SK-Br-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

(viii) Оценка блокирования лиганда.

Способность описанных антител против HER3 блокировать связывание лиганда оценивали путем исследования связывания нейрорегулина с клетками MCF7, предварительно обработанными либо MOR09823, либо MOR09825. Присутствие либо MOR09823, либо MOR09825, не имело значительного эффекта на способность нейрорегулина связывать клетки MCF7, в то время как положительный контроль, используемый в эксперименте (Mab3481), был способен значительно препятствовать связыванию нейрорегулина (см. фиг. 9). Эти результаты согласуются с кристаллической структурой, поскольку MOR09823 взаимодействует с доменами 2 и 4, в то время как предположено, что основные точки контакта для взаимодействия HER3 с нейрорегулином в основном кластеризуются в доменах 1 и 3. Учитывая то, что нейрорегулин способен связывать неактивную конформацию HER3 (Kani et al., (2005) *Biochemistry* 44: 15842-15857), является вероятным, что MOR09823 и MOR09825 функционируют, препятствуя перестройке доменов HER3, необходимой для передачи сигнала, или препятствуя димеризации рецепторов.

(ix) Оценка блокирования лиганда (биохимическая).

Для исследования того, могут ли MOR09823 и нейрорегулин связывать HER3 одновременно, был разработан биохимический анализ с использованием технологии Biacore™. Анализы взаимодействия проводили путем улавливания биотинилированного нейрорегулина на поверхности сенсорного чипа Biacore™ CAP (GE Healthcare) с использованием набора Biotin CAPture (GE Healthcare). Комплексы HER3 получали путем инкубации HER3-FC человека с возрастающими концентрациями либо MOR09823, либо 105.5 (Thermo Scientific), либо IgG человека. Предварительно сформированные комплексы HER3/антитело инжестировали над эталонной и активной поверхностями и исследовали взаимодействие HER3 с нейрорегулином.

Контрольный IgG не имел эффекта на образование комплекса HER3/нейрорегулин, в то время как было выявлено, что 105.5 значительно ингибирует способность HER3 связывать нейрорегулин, что подтверждает его описание в качестве блокирующего лиганда антитела (фиг. 10). Напротив, комплексы HER3/MOR09823 были способны связывать нейрорегулин, что демонстрирует, что MOR09823 не препятствует связыванию лиганда. Интересно, что дозозависимое увеличение величин RU единственно наблюдали, когда инжестировали комплексы MOR09823/HER3. Эти данные указывают на то, что на поверхности чипа образуется тримерный комплекс, содержащий нейрорегулин, HER3 и MOR09823. Способность этого тримерного комплекса образовываться предсказывается кристаллической структурой HER3/MOR09823, поскольку связывание MOR09823 не закрывает участок связывания лиганда HER3, что указывает на то, что связывание нейрорегулина и MOR09823 не является взаимоисключающим.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связываются как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3 без блокирования одновременного связывания лиганда HER3, такого как нейрорегулин. Хотя предоставление теории не требуется, возможно, что антитело или его фрагмент, связывающиеся как с доменом 2, так и с доменом 4 HER3, содержат HER3 в неактивной конформации без блокирования участка связывания лиганда на HER3. Таким образом, лиганд HER3 (например, нейрорегулин) способен связываться с HER3 одновременно с антителом.

Антитела по изобретению или их фрагменты ингибируют как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую активацию HER3 без препятствования связыванию лиганда. Это считается преимуществом по следующим причинам.

(i) Терапевтическое антитело может иметь клиническую применимость при широком спектре опухолей, по сравнению с антителом, которое нацелено на один механизм активации HER3 (т.е. лиганд-

зависимый или лиганд-независимый), поскольку каждый механизм запускает различные типы опухолей.

(ii) Терапевтическое антитело может быть эффективным в типах опухолей, в которые одновременно вовлечены оба механизма активации HER3. Антитело, нацеленное на один механизм активации HER3 (т.е. лиганд-зависимый или лиганд-независимый), будет проявлять меньшую эффективность или отсутствие эффективности в этих опухолях.

(iii) На эффективность антитела, которое ингибирует лиганд-зависимую активацию HER3 без препятствования связыванию лиганда, менее вероятно будет оказывать отрицательное влияние увеличение концентрации лиганда. Это приведет либо к увеличенной эффективности в типе опухоли, запускаемом очень высокой концентрацией лиганда HER3, либо к сниженной склонности к устойчивости к лекарственному средству, где устойчивость опосредуется активацией лигандов HER3.

(iv) Антитело, которое ингибирует активацию HER3 путем стабилизации неактивной формы, будет менее склонным к устойчивости к лекарственному средству, запускаемой альтернативными механизмами активации HER3.

Следовательно, антитела по изобретению можно использовать для лечения состояний, при которых существующие терапевтические антитела являются клинически неэффективными.

(x) Ингибирование *in vivo* активности HER3 и эффект на рост опухоли.

Для определения активности *in vivo* описанных антител против HER3, MOR09823 исследовали в моделях опухоли как ВхРС-3, так и ВТ-474. Было продемонстрировано, что MOR09823 ингибирует активность HER3, о чем свидетельствует значительное уменьшение уровней опухоли pHER3 (фиг. 11). Передача сигнала ниже HER3 значительно ингибировалась, что демонстрируется сниженными уровнями pAkt как в ВхРС-3, так и в ВТ-474 (фиг. 11). В исследовании эффективности на ВТ-474, запускаемой HER2, повторяющаяся обработка MOR10701 обеспечивала 74% ингибирование роста опухоли (см. фиг. 12А), в то время MOR10703 обеспечивало 83% ингибирование. В модели роста опухоли ВхРС3 как MOR10701, так MOR10703 высокоэффективно ингибировали запускаемый лигандом рост опухоли (см. фиг. 13).

(xi) Комбинации лекарственных средств *in vitro* и их влияние на рост клеток.

Поскольку рост опухолевых клеток часто запускается несколькими каскадами передачи сигнала, авторы настоящего изобретения оценивали, являются ли комбинации MOR09823 или MOR10703 с различными направленными средствами, полезными для блокирования пролиферации клеток. Выбранные направленные средства в основном ингибировали HER2 (трастузумаб, лапатиниб), EGFR (цетуксимаб, эрлотиниб), PI3K/mTOR (BEZ235), PI3K (ВКМ120), PI3КА (ВУЛ719) и mTOR (RAD001), поскольку эти мишени обычно активированы в опухолях человека. Анализ изоболограммы (см. фиг. 14) показал, что MOR09823 и MOR10703 проявляли синергические комбинации лекарственных средств с трастузумабом, лапатинибом, эрлотинибом, цетуксимабом, BEZ235, ВКМ120, ВУЛ719 и RAD001. Эти данные указывают на то, что ингибирование передачи сигнала HER3 является особенно полезным в случае ингибиторов, которые нацелены на рецепторные тирозинкиназы или каскад передачи сигнала PI3K.

(xii) Комбинации лекарственных средств с MOR10703 *in vivo*.

Ввиду ингибирования HER3 в комбинации с нацеленными на рецепторную тирозинкиназу средствами *in vitro*, авторы настоящего изобретения исследовали влияние либо MOR10701, либо MOR10703 в комбинации с трастузумабом и эрлотинибом *in vivo*. В ксенотрансплантатах ВТ-474 (см. фиг. 15А), комбинация либо MOR10701, либо MOR10703 (20 мг/кг) с субоптимальной дозой трастузумаба (1 мг/кг) была достаточной для индукции регрессии опухоли (% Т/С = -50 и -37 соответственно). В ксенотрансплантатах поджелудочной железы L3.3 комбинация MOR10703 (20 мг/кг) с вводимым каждые сутки эрлотинибом (50 мг/кг) приводила к остановке роста опухоли (% Т/С = 3, см. фиг. 15В). На обеих моделях комбинация двух лекарственных средств была значительно более эффективной, чем любое лекарственное средство отдельно, таким образом, подтверждая более ранние данные авторов настоящего изобретения *in vitro*, касающиеся пользы комбинации нацеленных на HER3 антител с нацеленными на ErbB средствами.

В общем, уникальная способность этого семейства антител стабилизировать неактивную конформацию HER3 приводит к значительной эффективности *in vivo* в моделях, где HER3 активируется либо лиганд-зависимым, либо лиганд-независимым образом. Более того, ингибирование HER3 этим семейством антител, по-видимому, является благоприятным в комбинации с широким множеством направленных терапевтических средств.

Пример 22. Антитела против HER3 при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ВРН), гинекомастии и эндометриозе.

Методика эксперимента.

Половозрелым крысам IGS Wistar Hannover в возрасте приблизительно 9 недель дозировали посредством внутривенной инъекции по схеме два раза в неделю 30, 75 и 200 мг/кг MOR10703. После завершения 13-недельного периода дозирования 10 крыс из каждой группы умерщвляли и основные органы извлекали для дальнейшего анализа. Кроме того, 6 крысам из группы дозы 200 мг/кг позволяли восстановиться после MOR10703 в течение 10 недель перед умерщвлением для определения обратимости каких-либо выявленных изменений. После умерщвления животных регистрировали массу органов перед



фиксацией в 10% нейтрально забуференном формалине. Срез тканей получали и оценивали с помощью микроскопического исследования.

Результаты.

У самцов крыс сниженную массу предстательной железы наблюдали при всех дозах, которая коррелировала со сниженной секрецией в предстательной железе и семенных пузырьках (табл. 18). Эти эффекты были обратимыми после восстановления в течение 10 недель. Различия в абсолютных средних значениях против контроля были следующими: 30 мг/кг: -31%, 75 мг/кг: -40 и 200 мг/кг: -35%. Атрофия молочной железы, по большей части умеренная или выраженная, присутствовала у всех самцов, которым проводили введение, и была необратимой после восстановления в течение 10 недель. Это изменение характеризовалось отсутствием обычно чрезмерного развития ацинусов и долей, наблюдаемого в мужской молочной железе. В противоположность контролям, редкие элементы протоков присутствовали в молочных железах всех самцов, которым проводили введение.

Таблица 18  
Связанные с MOR10703 отличия в массе органов у самцов крыс

Пол	Мужской			
Доза (мг/кг)	0	30	75	200
Исследованное количество	10	10	10	10
Средняя масса тела (г)	412	390	392	397
(% отличие)	(-)	-5	-4	-4
Средняя масса головного мозга (г)	2,1	2,1	2,1	2,1
(% отличие)	(-)	-3	-3	-1
Предстательная железа				
Абсолютное среднее значение (г)	0,9	0,6 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>
(% отличие)	(-)	-31	-40	-35
Отн. <sup>b</sup> массы тела (%)	0,22	0,16 <sup>c</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,15 <sup>c</sup>
(% отличие)	(-)	-28	-38	-33
Отн. массы головного мозга	43	31	27 <sup>c</sup>	28 <sup>c</sup>
(% отличие)	(-)	-29	-38	-35

<sup>a</sup> Выражено в качестве процентного отличия средних значений для групп (% отличие).

<sup>b</sup> Относительно.

<sup>c</sup> На основе статистического анализа средних значений для групп, величины значительно отличаются от контрольной группы.

У самок сниженную массу матки наблюдали во всех дозах, что было обратимо после восстановления в течение 10 недель (табл. 19). Отличия абсолютного среднего значения от контроля составляли 30 мг/кг: -24%, 75 мг/кг: -27% и 200 мг/кг: -19%.

Атрофия эндометрия, наблюдаемая в качестве выраженного снижения железистого эпителия в матке во всех дозах  $\geq 30$  мг/кг/сутки, коррелировала с уменьшением массы матки, наблюдаемым в конце лечения. Это было немного обратимым после восстановления в течение 10 недель, поскольку присутствовало увеличенное количество железистого эпителия, хотя и не настолько, как у контрольных животных. Другие органы репродуктивной системы: яичники, яйцеводы, шейка матки и влагалище выглядели находящимися в пределах нормы, учитывая то, что могли наблюдаться различные стадии цикла.

Таблица 19

## Связанные с MOR10703 отличия в массе органов у самок крыс

Пол	Самки			
Доза (мг/кг)	0	30	75	200
Исследованное количество	10	10	10	10
Средняя масса тела (г)	237	246	239	241
(% отличие)	(-)	-4	-1	-2
Средняя масса головного мозга (г)	1,9	2,0	1,9	2,0
(% отличие)	(-)	-1	-1	-2
Матка				
Абсолютное среднее значение (г)	0,48	0,36 <sup>c</sup>	0,35 <sup>c</sup>	0,39
(% отличие)	(-)	-24	-27	-19
Отн. <sup>b</sup> массы тела (%)	0,20	0,15 <sup>c</sup>	0,15 <sup>c</sup>	0,16
(% отличие)	(-)	-26	-27	-21
Отн. массы головного мозга	25	18 <sup>c</sup>	18 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>
(% отличие)	(-)	-29	-38	-35

<sup>a</sup> Выражено в качестве процентного отличия средних значений для групп (% отличие).

<sup>b</sup> Относительно.

<sup>c</sup> На основе статистического анализа средних значений для групп, величины значительно отличаются от контрольной группы. Относятся к данным в таблице для истинных уровней значимости и использованных исследований.

## Обсуждение.

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ВРН) является распространенным заболеванием у стареющих мужчин, которое характеризуется незлокачественным увеличением предстательной железы, что приводит к сдавлению уретры и приводит к проблемам с мочеиспусканием и мочевым пузырем (Maharokail W., van Sluijs F.J. & Schalken J.A. 2000, Prostate Cancer and Prostatic Diseases 3, 28-33). Анатомические или микроскопические доказательства ВРН присутствуют при аутопсии приблизительно у 55% мужчин в возрасте 60-70 лет. Предпочтительным для выбора способом лечения на протяжении многих лет является трансуретральная резекция предстательной железы. Следовательно, ВРН является одной из наиболее распространенных причин для хирургического вмешательства у пожилых мужчин. Менее инвазивные способы лечения включают:

(i) альфа 1-блокаторы (доксазозин, празосин, тамсулозин, теразозин и алфузозин) являются классом лекарственных средств, также используемых для лечения высокого кровяного давления. Эти лекарственные средства расслабляют мышцы шейки мочевого пузыря и предстательной железы, таким образом обеспечивая более легкое мочеиспускание;

(ii) финастерид и дутастерид снижают уровни андрогенов, таким образом, снижая размер предстательной железы, увеличивая скорость потока мочи и снижая симптомы ВРН. Период для обнаружения улучшения симптомов может составить от 3 до 6 месяцев. Потенциальные побочные эффекты, связанные с применением финастерида и дутастерида, включают снижение полового влечения и импотенцию.

Результаты в разделе "Эксперименты" впервые демонстрируют, что ВРН является нейрорегулин-зависимым заболеванием. Также данные демонстрируют, что MOR10703 значительно снижало размер предстательной железы у половозрелых крыс без влияния на уровни гормонов, что указывает на то, что MOR10703 может быть пригодным для лечения ВРН.

Для дальнейшего исследования MOR10703 и других антител против HER3 в качестве терапевтических средств от ВРН, полученные хирургически образцы первичной ВРН человека можно трансплантировать бестимусным мышам или крысам и исследовать эффект антител против Her3 с использованием моделей (Otto U. et al. Urol. Int. 1992; 48:167-170). Альтернативно, аспекты ВРН могут быть индуцированы у кастрированных собак посредством длительного введения 5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -вместе с эстрадиолом, и антитела против HER3 можно исследовать в этих моделях на собаках (Walsh P.C. Wilson J.D. J.

Clin. Invest. 1976; 57:1093-1097).

Физическим проявлением гинекомастии является увеличение молочной железы у мужчин, оно обычно происходит в обеих молочных железах, однако иногда происходит только в одной из них, что известно как асимметричная или односторонняя гинекомастия. Гинекомастия обычно вызывается:

(i) повышенными уровнями эстрогена, что приводит к несбалансированному соотношению тестостерона и эстрогена;

(ii) антагонистами андрогенов или антиандрогенами, используемыми для лечения рака предстательной железы или ВРН. Эти лекарственные средства подавляют тестостерон, однако при подавлении тестостерона начинает повышаться эстроген.

Хотя в настоящее время оценивают ряд экспериментальных лекарственных средств, в настоящее время не существует одобренных способов лечения гинекомастии. Следовательно, гинекомастию лечат путем хирургического удаления ткани молочной железы. Наблюдение индуцируемой MOR10703 необратимой атрофии мужской молочной железы указывает на то, что оно может быть полезным для лечения гинекомастии.

Для дальнейшего исследования MOR10703 и других антител против HER3 в отношении лечения гинекомастии человека, можно использовать модели гинекомастии на трансгенных мышцах. Эти модели были разработаны путем экспрессии ароматазы человека в молочной железе мыши, и они повторяют многие аспекты гинекомастии у человека (Li et al., *Endocrinology*, 2002;143:4074-4083; Tekmal et al., *Cancer Res* 1996;56:3180-318).

MOR10703 и другие антитела против HER3 также можно исследовать в отношении лечения эндометриоза гинекологического состояния, при котором клетки выстилки матки (эндометрия) появляются и распространяются извне полости матки. Главным, но не универсальным симптомом эндометриоза является боль в области таза в различных проявлениях. Хотя основные причины эндометриоза не хорошо охарактеризованы, полагают, что он зависит от присутствия эстрогена. Поскольку MOR10703 индуцировало атрофию эндометрия у самок мышей, приводящую к снижению массы матки, его можно использовать для лечения эндометриоза. Для дальнейшего исследования эффектов MOR10703 и других антител против HER3 на эндометриоз эндометрий человека в пролиферативной фазе можно имплантировать в брюшную полость бестимусных мышей с нормальным циклом и овариэктомией или диабетических мышей без ожирения (NOD) с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) с циклом, и этих мышей SCID можно использовать в качестве моделей (Grummer et al., 2001. *Human Reproduction*; 16; 1736-1743).

Пример 23. Исследования *in vitro* для оценки антител против HER3 при раке пищевода.

Исследования комбинирования с лекарственным средством для пищевода *in vitro*.

Для оценки возможности комбинирования нацеленных на HER3 антител с направленной терапией, MOR10703 комбинировали с цетуксимабом или BYL719 в анализах жизнеспособности клеток. Приблизительно 1000-1200 клеток KYSE140 и KYSE180 высевали в 384-луночные планшеты в подходящей культуральной среде, дополненной 2% FBS, и позволяли им прикрепляться в течение ночи при 37°C. Затем в лунки добавляли соответствующие комбинации лекарственных средств (типичные конечные концентрации лекарственного средства для BYL719 находились в диапазоне от 2,8 мкМ до 3,8 нМ; для цетуксимаба они находились в диапазоне от 93 до 0,13 нМ; для MOR10703 они находились в диапазоне от 100 до 4,1 нМ) последовательно добавляли в лунки, так чтобы каждый планшет включал кривую доза-эффект для каждого лекарственного средства в двумерной матрице. Затем обработанные клетки инкубировали в течение 96-120 ч. В конце обработки лекарственным средством в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo для лизиса клеток и регистрировали сигналы люминесценции с использованием устройства для считывания планшетов Envision. Степень ингибирования роста, полученную для каждой комбинации, вычисляли и активность комбинирования определяли с использованием модели аддитивности Loewe.

Комбинации лекарственных средств для пищевода *in vitro* и влияние на рост клеток.

Поскольку рост опухолевых клеток часто запускается несколькими каскадами передачи сигнала, комбинации MOR10703 с цетуксимабом или BYL719 оценивали для определения того, являются ли они полезными для блокирования пролиферации клеточных линий рака пищевода. Выбранные направленные средства в основном ингибировали EGFR (цетуксимаб) и PI3K (BYL719), поскольку эти мишени обычно активированы в опухолях человека. Анализ изоболограммы (см. фиг. 16) показал, что MOR10703 проявляло синергические комбинации лекарственных средств с цетуксимабом и BYL719. Эти данные демонстрируют, что ингибирование передачи сигнала HER3 имеет особую пользу для ингибиторов, которые нацелены на рецепторные тирозинкиназы или каскад передачи сигнала PI3K.

Пример 24. Исследования *in vivo* для оценки антител против HER3 при раке пищевода.

Для оценки *in vivo* возможности комбинирования направленных против HER3 антител с направленными терапевтическими средствами MOR10703 комбинировали с цетуксимабом или BYL719 и исследовали в двух моделях с ксенотрансплантатами *in vivo*.

(i) Ксенотрансплантаты KYSE140 *in vivo*.

Клетки KYSE140 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку без антибиотиков, до момента имплантации. Клетки KYSE140 собирали на экспоненциальной фазе роста. Десять миллионов клеток, смешанных с PBS/матригелем (50:50), подкожно имплантировали в верхнюю правую боковую область мышей SCID-Beige. На 28 сутки опухоли измеряли и животных с объемом опухоли приблизительно 200 мм<sup>3</sup> включали в исследование эффективности. Как правило, в исследования эффективности включали всего 10 животных на группу. Для исследования отдельных терапевтических средств и комбинаций, животным внутривенно дозировали посредством инъекции в боковую хвостовую вену MOR10703 или цетуксимаб. BYL719 составляли в 0,5% метилцеллюлозе и вводили посредством перорального искусственного питания.

(ii) Ксенотрансплантаты KYSE180 *in vivo*.

Клетки KYSE180 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку без антибиотиков, до момента имплантации. Клетки KYSE180 собирали на экспоненциальной фазе роста. Пять миллионов клеток подкожно имплантировали в верхнюю правую боковую область мышей nude. На 18 сутки опухоли измеряли, и животных с объемом опухоли приблизительно 200 мм<sup>3</sup> включали в исследование эффективности. Как правило, в исследования эффективности включали всего 10 животных на группу. Для исследования отдельных терапевтических средств и комбинаций, животным внутривенно дозировали посредством инъекции в боковую хвостовую вену MOR10703 или цетуксимаб. BYL719 составляли в 0,5% метилцеллюлозе и вводили посредством перорального искусственного питания.

(iii) Первичные ксенотрансплантаты пищевода *in vivo*.

Первичные опухоли пищевода человека пассировали у мышей. Когда размер опухоли достигал приблизительно 150 мм<sup>3</sup>, животных включали в исследование эффективности. Для исследования отдельных терапевтических средств и комбинаций, животным внутривенно дозировали посредством инъекции в боковую хвостовую вену MOR10703 или цетуксимаб. BYL719 составляли в 0,5% метилцеллюлозе и вводили посредством перорального искусственного питания.

Ингибирование *in vivo* HER3 и эффект на рост опухоли пищевода.

Для определения активности *in vivo* описанных антител против HER3, MOR10703 исследовали в моделях опухоли пищевода как KYSE140, так и KYSE180, а также в двух моделях первичной опухоли пищевода, CHES007 и CHES015. Как в модели KYSE140, так и в модели KYSE180 *in vivo* было продемонстрировано, что обработка единственным средством MOR10703 эффективно ингибирует рост опухоли (фиг. 17). В KYSE180 комбинация MOR10703 и BYL719 была достаточной для индукции значительной регрессии опухоли. Эти данные были расширены на модели первичных опухолей пищевода, где комбинация MOR10703 либо с цетуксимабом, либо с BYL719, также индуцировала мощную регрессию опухоли (фиг. 18). Взятые вместе, эти данные подтверждают более ранние данные авторов настоящего *in vivo* относительно пользы комбинирования направленных на HER3 антител с направленными либо на EGFR, либо на PI3K средствами.

Пример 25. Исследования *in vivo* для оценки комбинаций HER3 с BYL719 при раке желудка.

Для оценки возможности комбинирования *in vivo* направленных на HER3 с направленными терапевтическими средствами при раке желудка MOR10703 комбинировали с BYL719 и исследовали в модели с ксенотрансплантатом *in vivo*.

(i) Ксенотрансплантат NCI-N87 *in vivo*.

Клетки NCI-N87 выращивали в культуральной среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, дополненной 10% инактивированной нагреванием FCS, 2 mM L-глутамином, 1 mM пируватом натрия, до момента имплантации. Опухоли NCI-N87 получали путем инъекции от  $8 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток (в HBSS, содержащей 50% об./об. матригель) подкожно. На 10 сутки опухоли измеряли и животных с объемом опухоли приблизительно 250 мм<sup>3</sup> включали в исследование эффективности. Для исследования групп отдельных терапевтических средств и комбинаций, животным внутривенно дозировали посредством инъекции в боковую хвостовую вену MOR10703. BYL719 составляли в 0,5% метилцеллюлозе и вводили посредством перорального искусственного питания.

Эффект комбинированного введения на рост опухоли желудка N87.

Как можно видеть для опухолей пищевода, комбинация MOR10703 и BYL719 была достаточной для индукции значительной длительной регрессии опухоли в модели опухоли желудка N87, таким образом далее подтверждая пользу комбинирования направленных на HER3 антител с направленными на PI3K средствами (см. фиг. 19).

Пример 26. Исследования *in vivo* для оценки комбинаций HER3 с цетуксимабом при плоскоклеточном раке головы и шеи (SCCHN).

Для оценки возможности комбинирования *in vivo* направленных на HER3 с направленными терапевтическими средствами при SCCHN MOR10703 комбинировали с цетуксимабом и исследовали в модели с ксенотрансплантатом *in vivo*.

(i) Ксенотрансплантат A253 in vivo.

Клетки A253 культивировали в DMEM, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку без антибиотиков, до времени имплантации. Клетки A253 собирали на экспоненциальной фазе роста. Пять миллионов клеток в 200 мкл PBS подкожно имплантировали в верхнюю правую боковую область мышей nude. На 25 сутки опухоли измеряли и животных с объемом опухоли приблизительно 200 мм<sup>3</sup> включали в исследование эффективности. Как правило, в исследования эффективности было включено всего 9 животных на группу. Для исследования отдельных терапевтических средств и комбинаций, животным внутривенно дозировали посредством инъекции в боковую хвостовую вену MOR10703 или цетуксимаб.

Эффект комбинированного введения на рост опухоли A253 SCCNH.

В модели A253 SCCNH обработка либо MOR10703, либо цетуксимабом в качестве единственного средства приводила к остановке роста опухоли. Комбинация MOR10703 с цетуксимабом была значительно более активной и приводила к регрессии опухоли (см. фиг. 20).

В совокупности, эти результаты демонстрируют, что MOR10703 в качестве единственного средства может ингибировать рост опухоли. Результаты также демонстрируют, что существует синергический эффект на регрессию опухоли, когда MOR10703 комбинируют с ингибиторами, которые нацелены на другие рецепторные тирозинкиназы или каскад передачи сигнала PI3K.

Включение в качестве ссылки.

Все ссылки, цитированные в настоящем описании, включая патенты, патентные заявки, статьи, справочники и т.п., и ссылки, цитированные в них, в тех случаях, когда еще не указаны, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Эквиваленты.

Представленное выше описание считается достаточным для того, чтобы позволить специалисту в данной области применять изобретение на практике. Представленные выше описание и примеры подробно описывают предпочтительные варианты осуществления изобретения и описывают наилучший способ, предусматриваемый авторами изобретения. Однако будет понятно, что независимо от того, насколько детально указанное выше может быть представлено в тексте, изобретение можно осуществлять на практике множеством способов, и изобретение должно быть истолковано в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы, включающий выбор пациента, страдающего доброкачественной гиперплазией предстательной железы; и введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала, чем осуществляется лечение доброкачественной гиперплазии предстательной железы, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

CDR1 варибельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 128;

CDR2 варибельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 129;

CDR3 варибельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 130;

CDR1 варибельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 131;

CDR2 варибельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 132;

CDR3 варибельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 133.

2. Способ по п.1, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 140.

3. Способ по п.1, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 144 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 145.

4. Способ по любому из пп.1-3, где конформационный эпитоп определен (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 (домена 2) HER3 и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 с SEQ ID NO: 1 или их подмножеством.

5. Способ по п.4, где конформационный эпитоп определен (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 (домена 2) и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 с SEQ ID NO: 1.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем, выбранным из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, интрацеребровентрикулярного, интрапаренхиматозного, интратекального, внутривенного, буккального, мукозального, назального и ректального введения.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляют в виде фармацевтической композиции, содержащей физиологически приемлемый носитель, эксци-

пиент или разбавитель.

8. Способ по п.7, дополнительно включающий дополнительное терапевтическое средство.

9. Способ по п.8, где указанное дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора HER1, ингибитора HER2, ингибитора HER3, ингибитора HER4, ингибитора mTOR и ингибитора PI3-киназы.

10. Способ по п.9, где указанное дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор HER1, выбранный из группы, состоящей из магузумаба (EMD72000), Erbitux®/цетуксимаба, Vectibi®/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 (U3 Pharma AG), AMG888 (Amgen), AV-203 (Aveo), MEHD7945A (Genentech), MOR10703 (Novartis) и низкомолекулярных соединений, которые ингибируют HER3; и

инибитор HER4.

11. Способ по п.10, где указанное дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из группы, состоящей из темсиролимуса, ридафоролимуса/дефоролимуса, AP23573, MK8669 и эверолимуса.

12. Способ по п.10, где указанное дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор PI3-киназы, выбранный из группы, состоящей из GDC 0941, BEZ235, BMK120 и BYL719.

13. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с рецептором HER3, так чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывались с конформационным эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в домене 2 и домене 4 рецептора HER3, и блокировали как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала для производства терапевтического средства для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ВРН), где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

CDR1 вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 128;

CDR2 вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 129;

CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 130;

CDR1 вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 131;

CDR2 вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 132;

CDR3 вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 133.

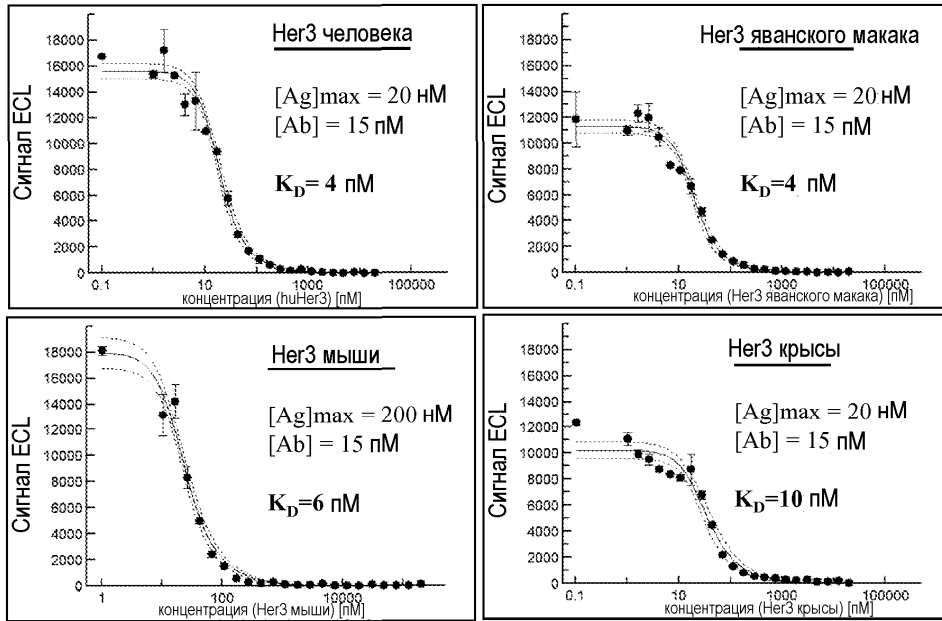
14. Применение по п.13, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 140.

15. Применение по п.13, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 144 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 145.

16. Применение по любому из пп.13-15, где конформационный эпитоп определен (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 (домена 2) HER3 и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 с SEQ ID NO: 1 или их подмножеством.

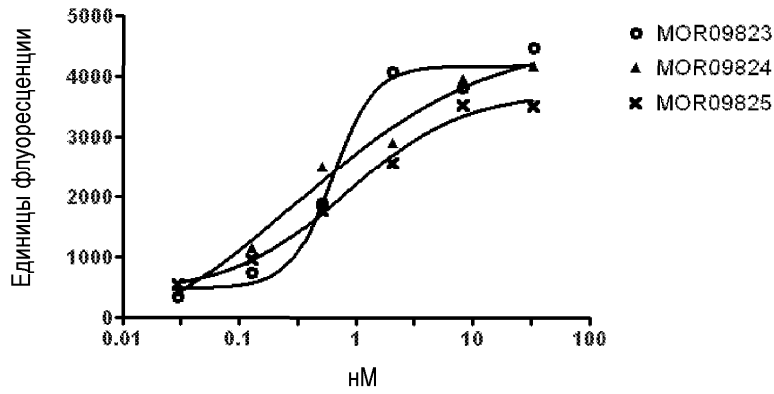
17. Применение по п.16, где конформационный эпитоп определен (i) аминокислотными остатками 265-277 и 315 (домена 2) и (ii) аминокислотными остатками 571, 582-584, 596-597, 600-602, 609-615 (домена 4) HER3 с SEQ ID NO: 1.

18. Применение по любому из пп.13-17, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляют в виде фармацевтической композиции, содержащей физиологически приемлемые носитель, эксципиент или разбавитель.



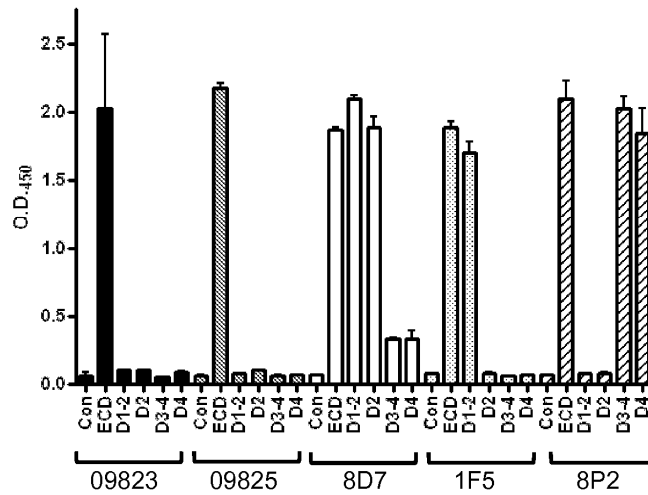
Фиг. 1

Титрование FACS для SK-Bv-3



Фиг. 2

ELISA для связывания домена HER3

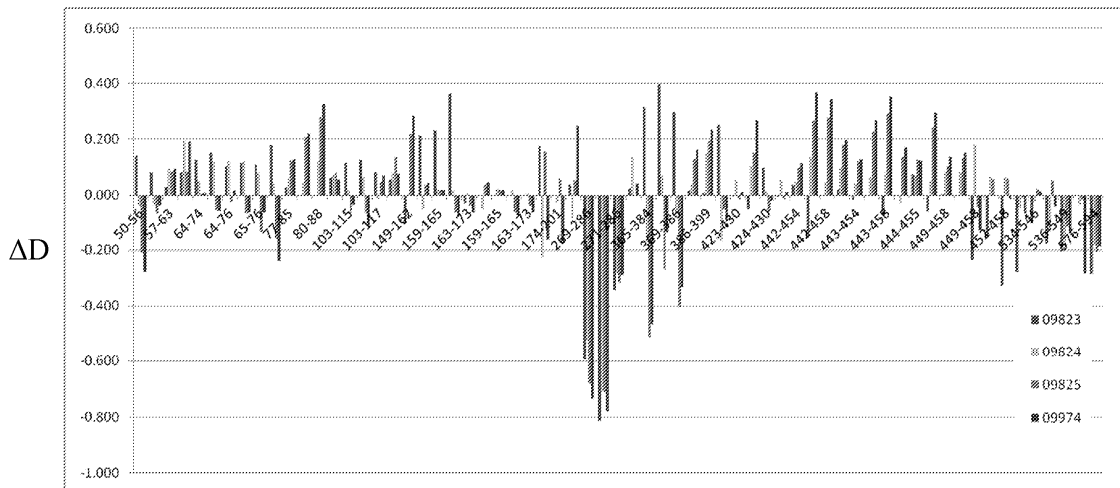


Фиг. 3



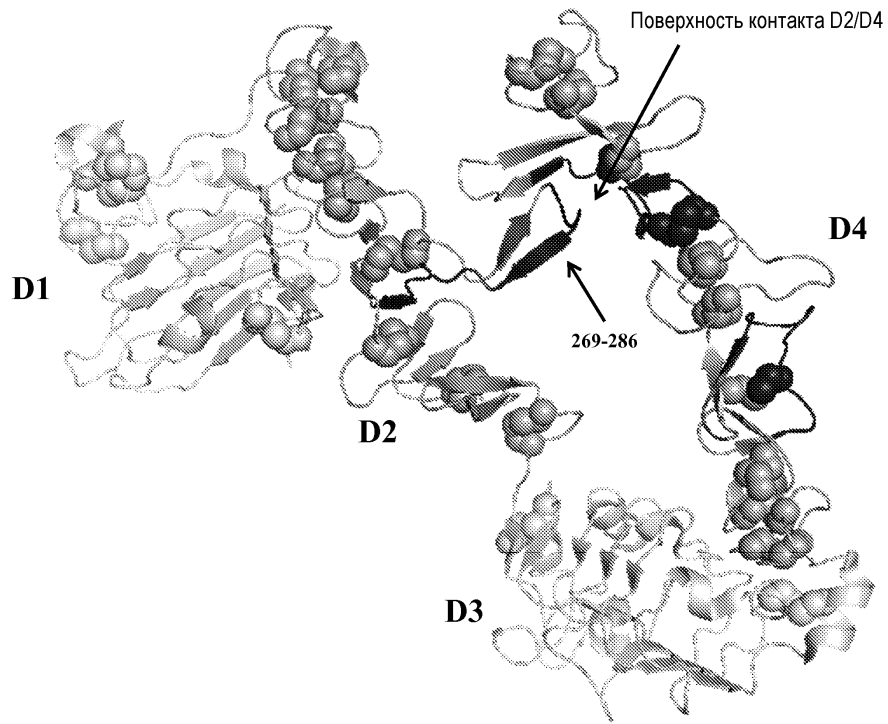
Фиг. 4А

ΔD [HER3: Fab] против HER3



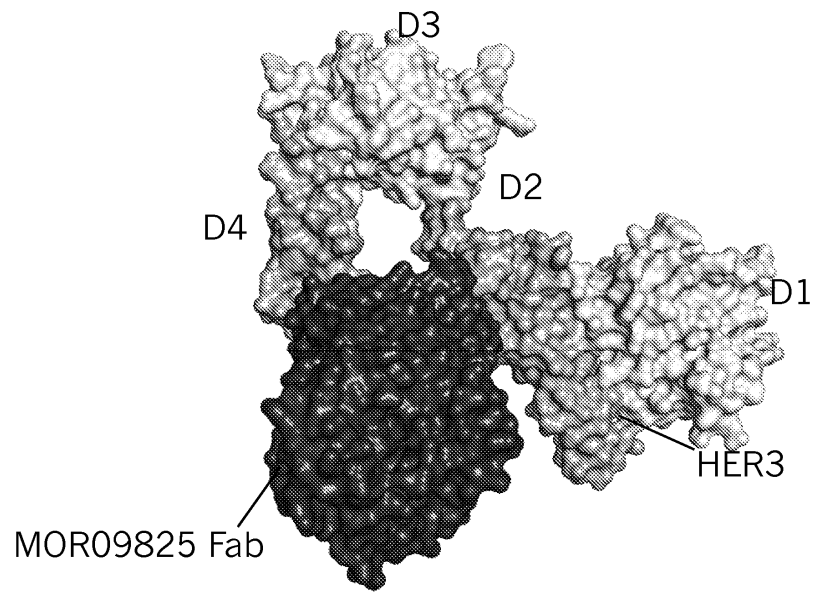
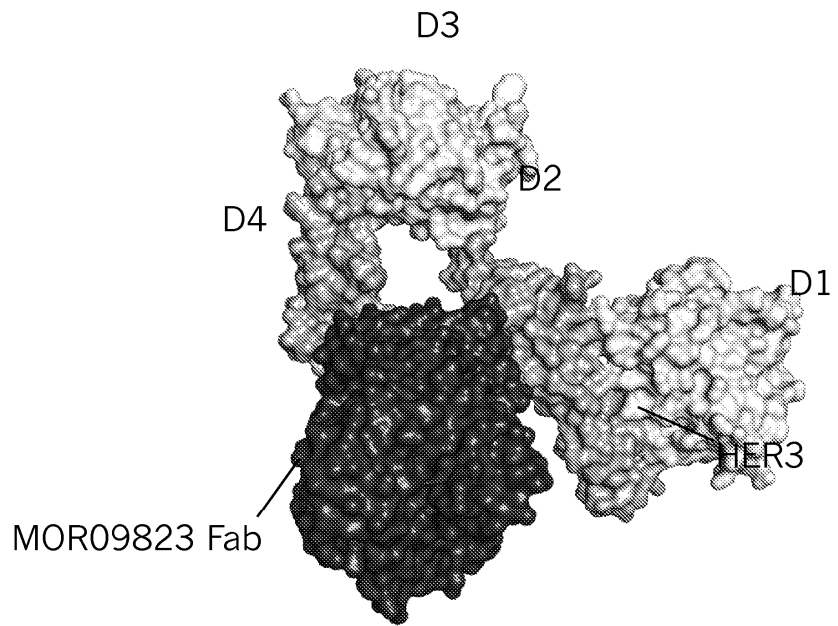
Фиг. 4В



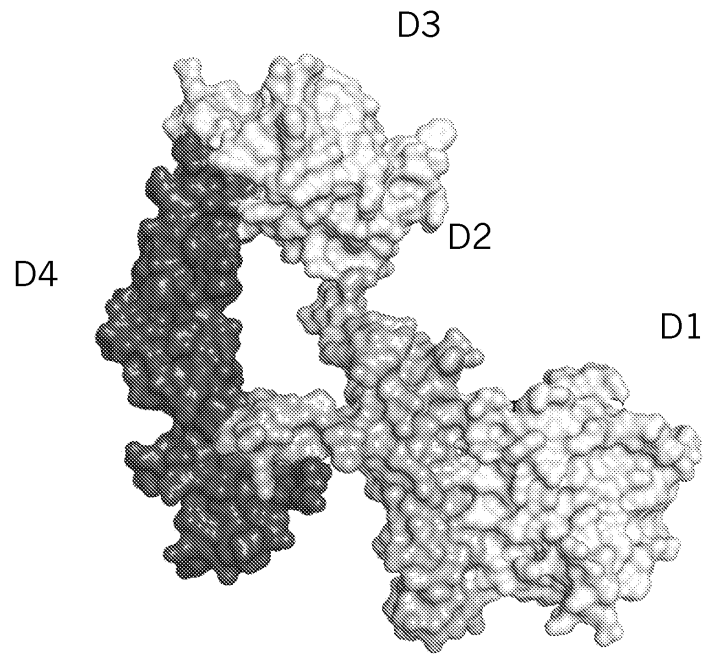


Фиг. 4С

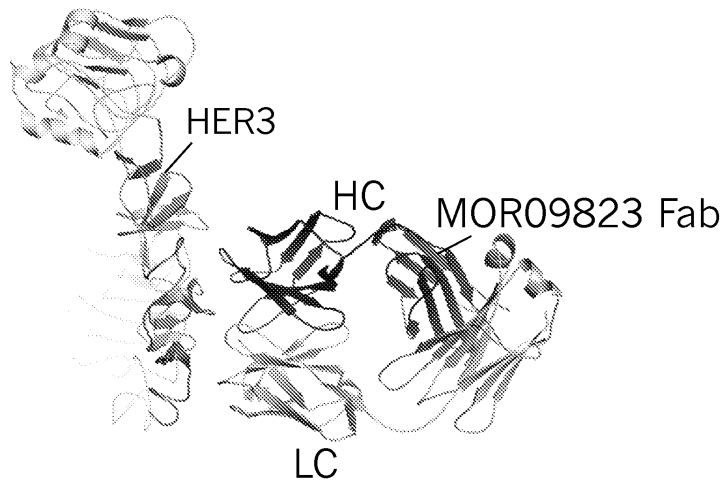
036739



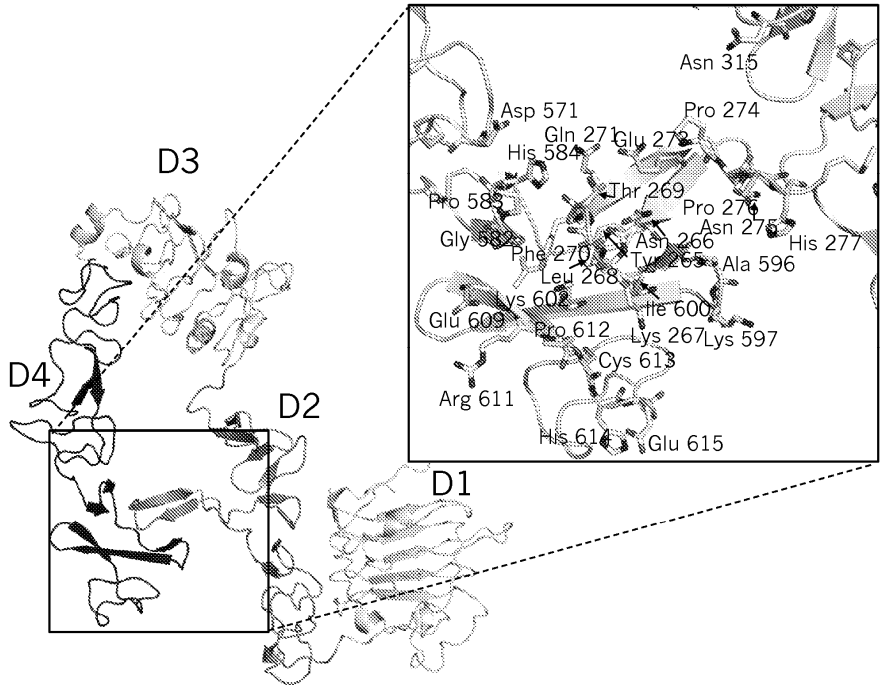
Фиг. 5А



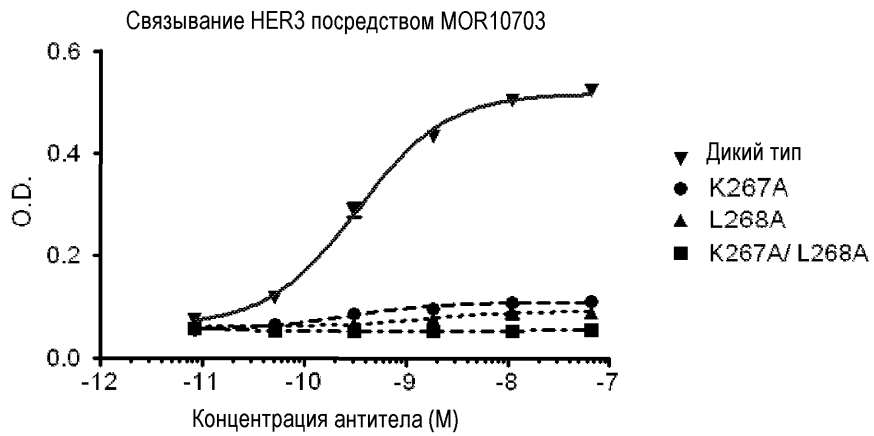
Фиг. 5B



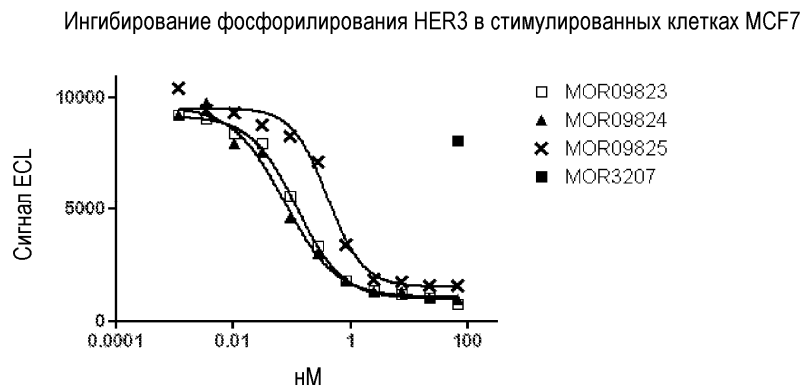
Фиг. 5C



Фиг. 5D

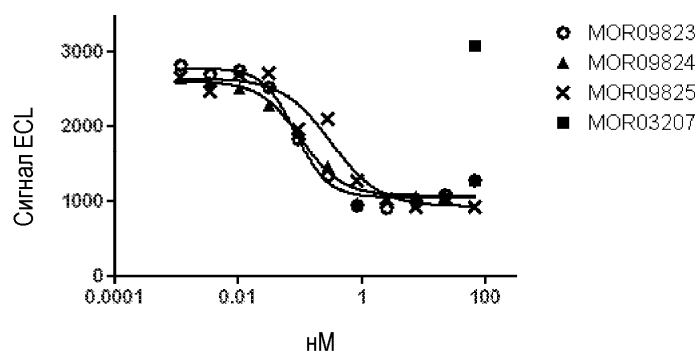


Фиг. 5E



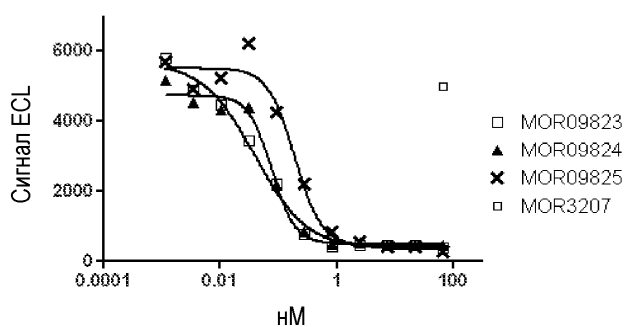
Фиг. 6A

## Ингибирование фосфорилирования HER3 в клетках SKBR3

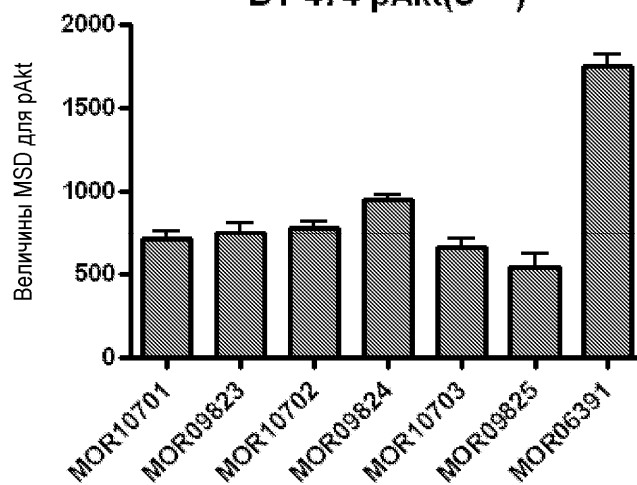


Фиг. 6B

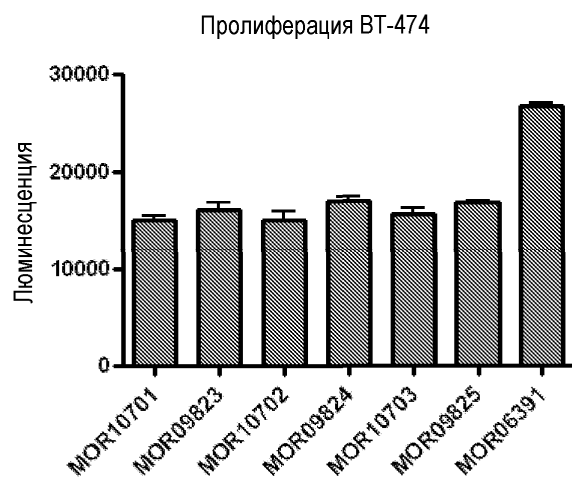
## Ингибирование фосфорилирования Akt в клетках SKBR3



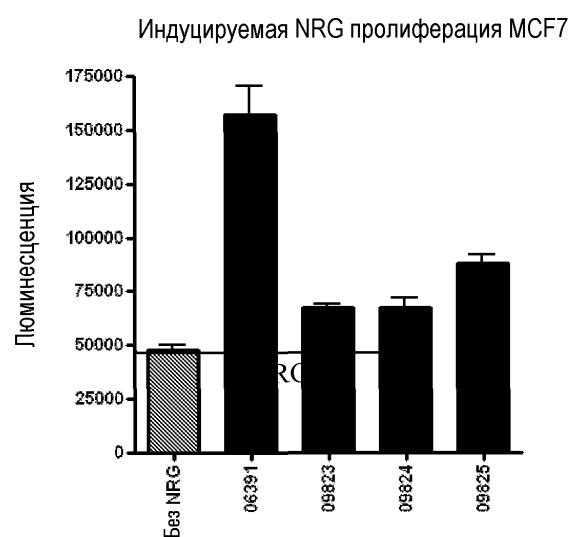
Фиг. 7A

BT-474 pAkt(S<sup>473</sup>)

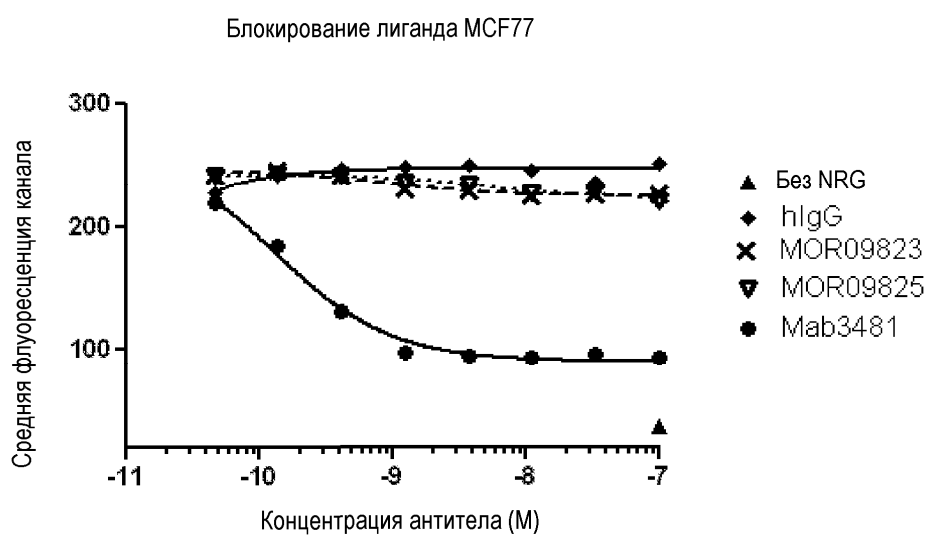
Фиг. 7B



Фиг. 8А

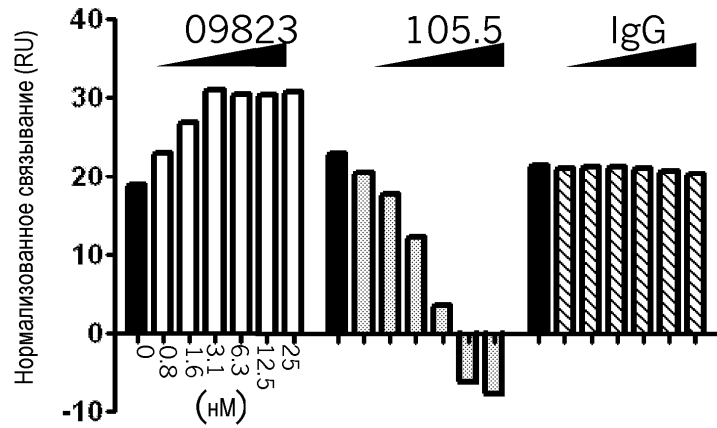


Фиг. 8В



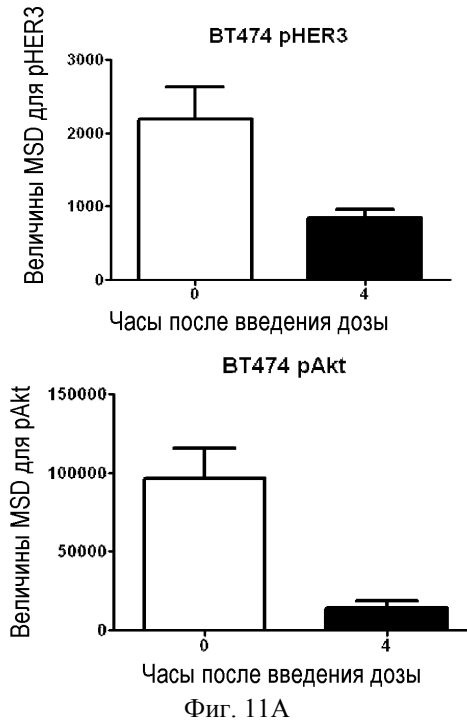
Фиг. 9

Анализ взаимодействия NRG/HER3



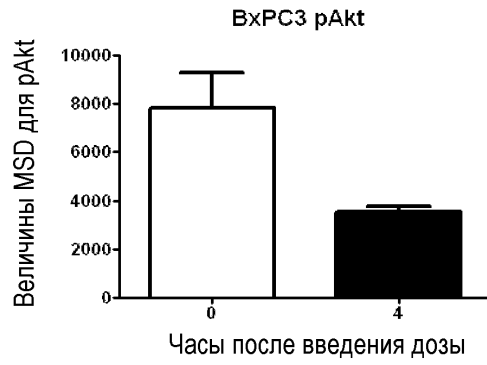
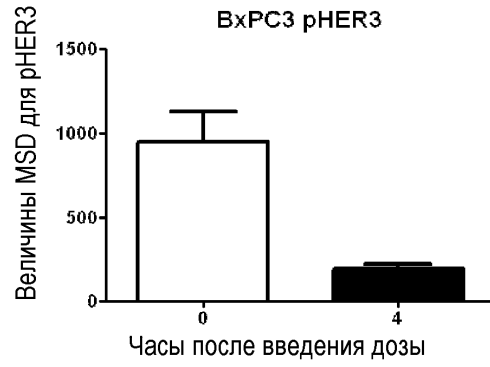
Фиг. 10

Обработанные MOR09823 ксенотрансплантаты BT474



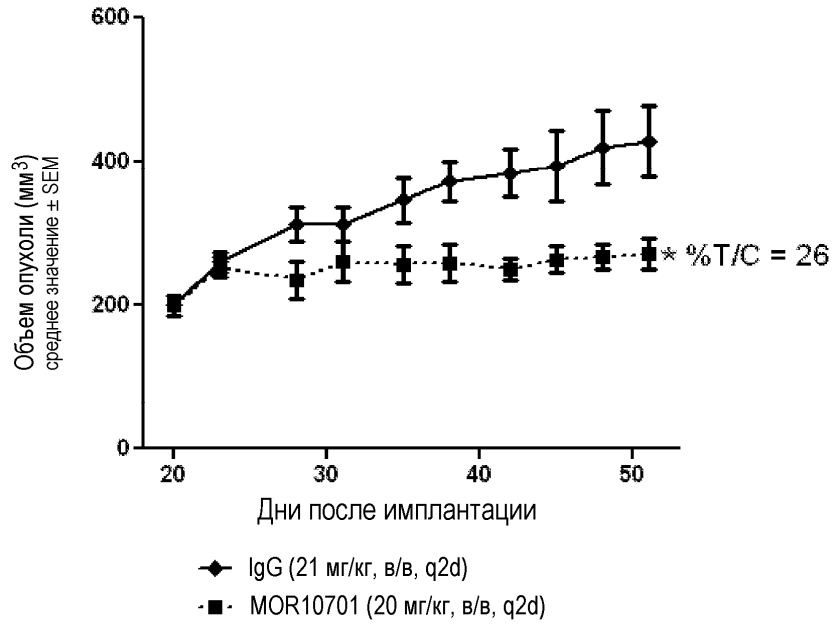
Фиг. 11А

Обработанные MOR09823  
ксенотрансплантаты ВхРС3



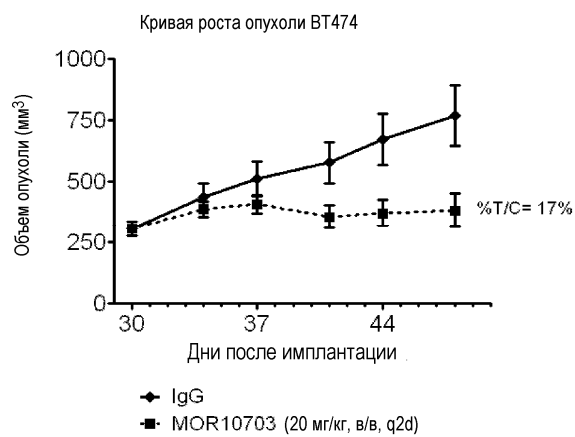
Фиг. 11В

Кривая роста опухоли ВТ474

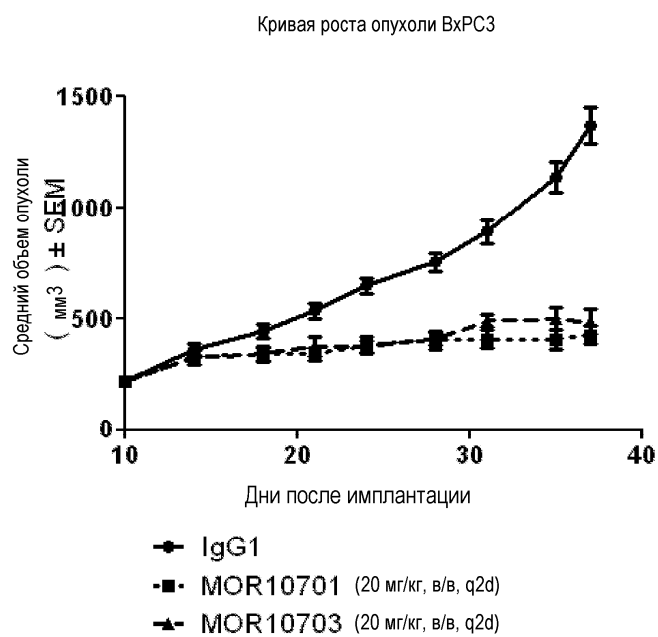


Фиг. 12А

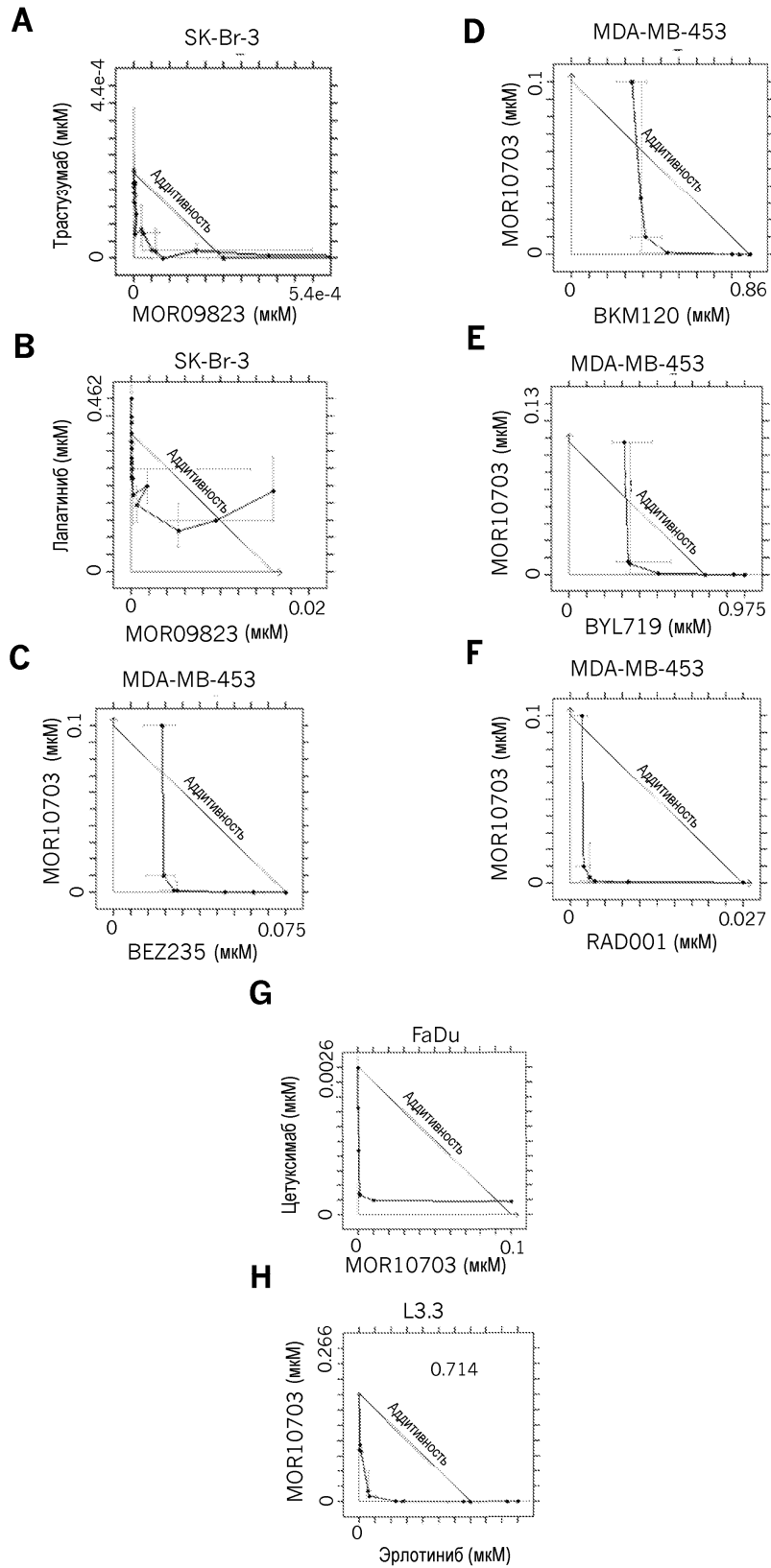




Фиг. 12В

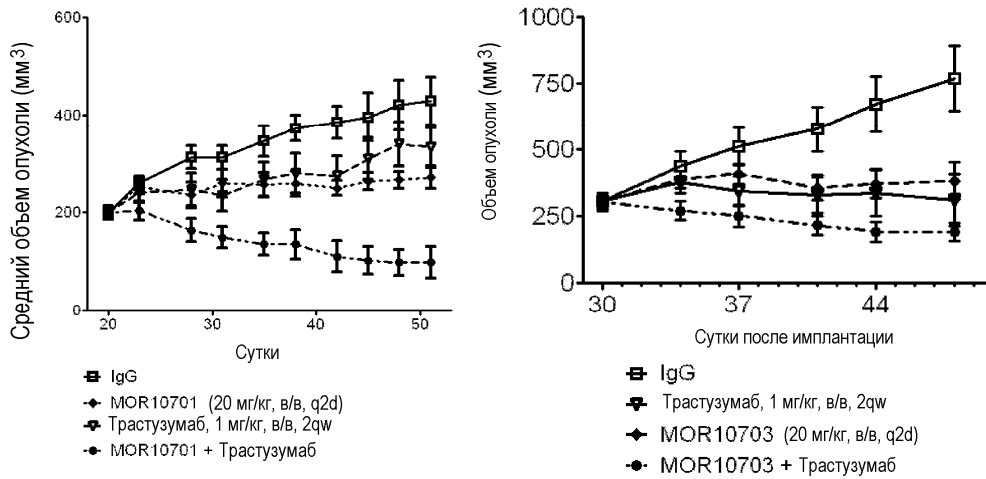


Фиг. 13



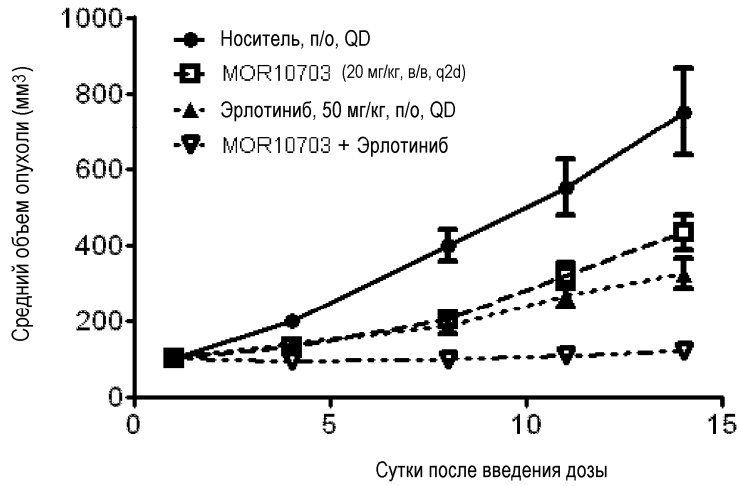
Фиг. 14

Кривая роста опухоли BT474



Фиг. 15А

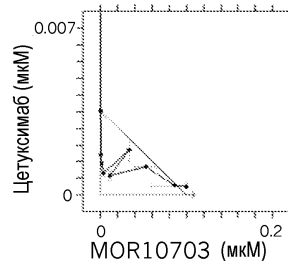
Кривая роста опухоли L3.3



Фиг. 15В

KYSE 140

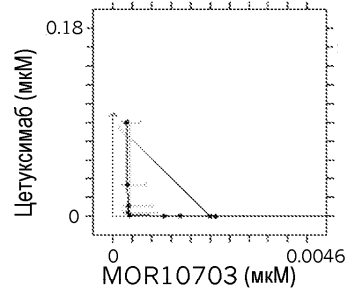
Изоболограмма



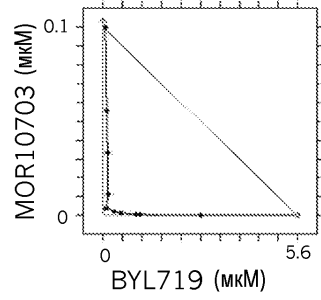
Фиг. 16

### KYSE 180

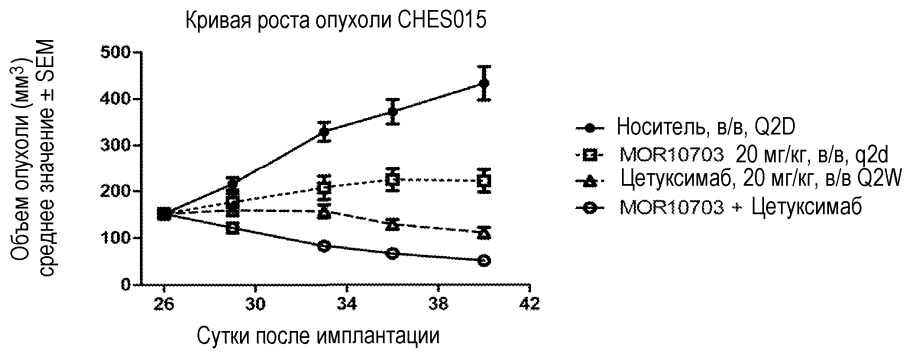
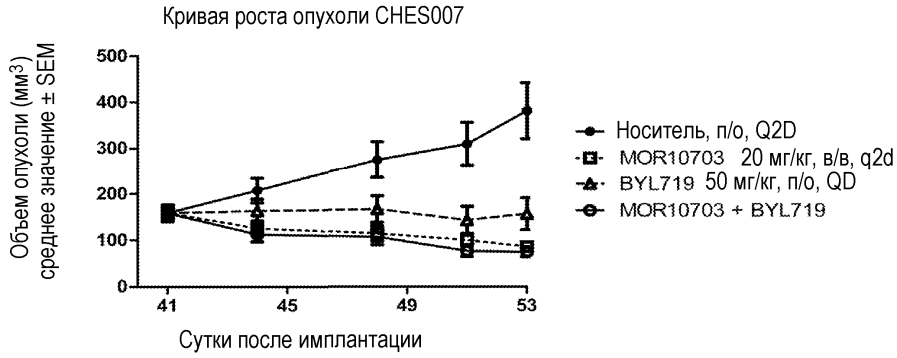
Изоболограмма



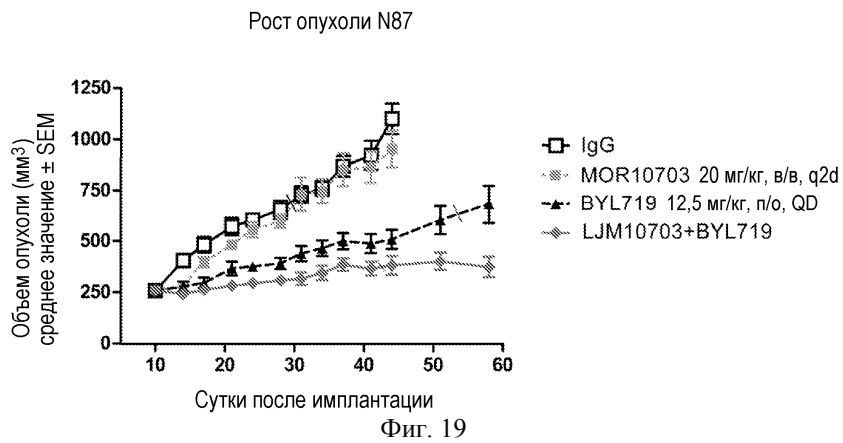
Изоболограмма



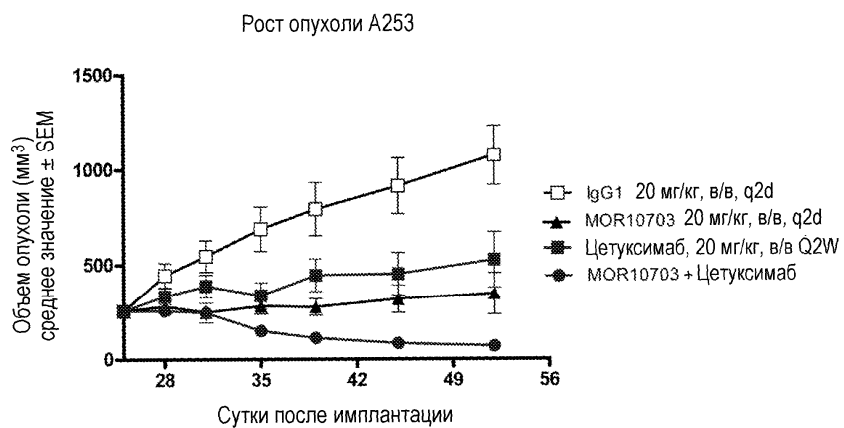
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

