

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992062** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.07.15

(22) Дата подачи заявки  
2018.04.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/32* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)

---

(54) **АГЕНТ, НАЦЕЛЕННЫЙ НА ErbB-2, И БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО С САЙТАМИ СВЯЗЫВАНИЯ АНТИГЕНА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ЭПИТОП НА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЧАСТИ ErbB-2 И ErbB-3, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНДИВИДА С ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ПО ErbB-2, ErbB-3 ИЛИ ErbB-2/3 ОПУХОЛЬЮ**

---

(31) 17164396.8; 15/476,260

(32) 2017.03.31

(33) EP; US

(86) PCT/NL2018/050205

(87) WO 2018/182421 2018.10.04

(71) Заявитель:

МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Тросби Марк, Гёин Сесилия Анна  
Вильгельмина, Моссан-Детай Давид  
Андре Батист, Логтенберг Тон (NL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

---

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены, среди прочего, антитела, содержащие первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3. Указанные антитела, как правило, могут снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Также предложены способы лечения и применения антител для визуализации и для лечения субъектов с положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/3 опухолью.

---

**A1**

**201992062**

**201992062**

**A1**

**Агент, нацеленный на ERBB-2, и биспецифическое антитело с сайтами связывания антигена, которые связывают эпитоп на внеклеточной части ERBB-2 и ERBB-3, для лечения индивида с положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/3 опухолью**

5

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки на Европейский патент № 17164396.8, поданной 31 марта 2017 г., и US 15/476260, поданной 31 марта 2017 г., содержания которых настоящим полностью включены  
10 в данную заявку посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к области антител. В особенности, оно относится к области терапевтических (человеческих) антител для лечения заболеваний, связанных с aberrантными клетками. Более конкретно, оно относится  
15 к антителам, которые связывают ErbB-2 и ErbB-3, и их применению для связывания положительных по ErbB-2 и ErbB-3 клеток, особенно опухолевых клеток.

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека (HER, которые также в совокупности называют сигнальной сетью ErbB) представляет  
20 собой семейство трансмембранных рецепторных тирозинкиназ (RTK). Указанное семейство включает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), также известный как ErbB-1 (или HER1), и гомологичные рецепторы ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4). Данные рецепторы (обзор которых представлен в Yarden и Pines 2012) широко экспрессированы на эпителиальных клетках.  
25 Повышенная экспрессия рецепторов HER или их лигандов, таких как херегулин (HRG) или эпидермальный фактор роста (EGF), является частым событием при раке у человека (Wilson, Fridlyand и др. 2012). Сверхэкспрессия ErbB-1 и ErbB-2, в частности, происходит в эпителиальных опухолях и связана с опухолевой инвазией, метастазированием, устойчивостью к химиотерапии и неблагоприятным  
30 прогнозом (Zhang, Verezov и др. 2007). Было показано, что в здоровой молочной железе ErbB-3 играет важную роль в росте и дифференцировке эпителия просвета. Например, утрата/ингибирование ErbB-3 приводит к избирательному разрастанию базального эпителия относительно эпителия просвета (Balko, Miller и др. 2012).

Связывание лиганда с внеклеточным доменом рецепторов RTK вызывает димеризацию рецепторов, как между одинаковыми подтипами (гомодимеризация), так и между различными подтипами (гетеродимеризация) рецепторов. Димеризация может активировать внутриклеточные тирозинкиназные домены, которые подвергаются аутофосфорилированию и, в свою очередь, могут активировать множество последующих способствующих пролиферации путей передачи сигналов, включая таковые, опосредованные митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК), и способствующий выживаемости путь Akt (обзор которых представлен в Yarden и Pines, 2012). Для ErbB-2 не обнаружили специфического эндогенного лиганда, и, следовательно, предполагают, что он обычно передает сигнал посредством гетеродимеризации (Sergina, Rausch и др. 2007). ErbB-3 может активироваться при связывании с его лигандами. Данные лиганды включают, но не ограничены нейрегулином (NRG) и херегулином (HRG).

Были обнаружены различные способы активации сигнальных путей через рецепторы семейства ErbB. Среди них представлены зависимая от лиганда и независимая от лиганда активация сигнальных путей. Сверхэкспрессированный ErbB-2 способен вызывать онкогенную передачу сигналов через гетеродимер ErbB-2:ErbB-3 даже в отсутствие лиганда ErbB-3 (Junttila, Akita и др. 2009). Активность ErbB-2 можно ингибировать специфическими к ErbB-2 антителами. Такие специфические к ErbB-2 антитела, например, применяют для лечения положительных по ErbB-2 (HER2+) опухолей. Проблема с такими способами лечения состоит в том, что часто опухоли ускользают от направленного на ErbB-2 лечения и продолжают расти даже в присутствии ингибирующего антитела. Наблюдали, что положительные по ErbB-2 опухоли, такие как опухоли молочной железы, яичников, шейки матки и желудка, могут ускользать от лечения путем селективного разрастания субпопуляции опухолевых клеток, у которых наблюдают повышенную экспрессию ErbB-3 (Ocana, Vera-Badillo и др. 2013) и/или экспрессию лиганда ErbB-3 (Wilson, Fridlyand и др. 2012). Также были обнаружены активирующие мутации в рецепторе ErbB-3.

Моноклональное антитело против ErbB-2 трастузумаб (герцептин) и специфичный к ErbB-1 цетуксимаб (эрбитукс) представляют собой два из нескольких моноклональных антител, одобренных для клинического применения.

Трастузумаб дает доказанное преимущество в выживаемости при метастатическом раке молочной железы (Arteaga, Sliwkowski и др. 2011). Точный механизм действия трастузумаба однозначно не установлен. Предположительные механизмы действия представляют собой ингибирование передачи сигналов через рецепторные тирозинкиназы (РТК) и вовлечение антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Другие описанные механизмы действия включают блокирование протеолитического расщепления внеклеточного домена ErbB-2, ингибирование ангиогенных факторов и повышение эндоцитоза рецептора. Другие агенты, которые препятствуют передаче сигналов ErbB-2, были одобрены или находятся в разработке для лечения рака молочной железы и других раков со сверхэкспрессией ErbB-2. Например, химическое соединение лапатиниб ингибирует тирозинкиназную активность обоих ErbB-1 и ErbB-2, и его применяют в терапии первой линии рака молочной железы с амплифицированным ErbB-2.

У пациентов с HER2+ метастатическим раком молочной железы устойчивость к трастузумабу либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с химиотерапией, обычно развивается в течение месяцев от начала терапии. Лишь часть пациентов с HER2+ метастатическим раком молочной железы отвечают на трастузумаб в качестве отдельного агента, позволяя предложить наличие механизмов устойчивости *de novo* у распространенных раков. Данные механизмы включают, среди прочих, передачу сигналов через другие рецепторы семейства HER и компенсаторную передачу сигналов через РТК, не относящиеся к семейству HER (They и др., Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies, Eur J Cancer (2014), том 50, выпуск 5, страницы 892-901 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.003>)). Например, сверхэкспрессия HER3 или его лигандов наряду с HER2 приводит к образованию гетеродимеров HER-2/HER-3 и приобретенной устойчивости к трастузумабу. Таким образом, считают, что антитело трастузумаб неэффективно для блокировки передачи сигналов, запускаемой лигандами ErbB-3 (Wehrman, Raab и др. 2006, Junttila, Akita и др. 2009, They и др. 2014).

Недавно моноклональное антитело пертузумаб было одобрено для применения в комбинации с трастузумабом на основании преимущества в дополнительных 5 месяцах выживаемости без прогрессирования (Baselga, Cortes и

др. 2012). Пертузумаб также связывает ErbB-2, но в участке, отличном от такового для трастузумаба.

Другие стратегии лечения положительных по ErbB-2 опухолей направлены на ErbB-3. Связывающие ErbB-3 моноклональные антитела продемонстрировали 5 активность в доклинических испытаниях (Schoeberl, Faber и др. 2010). Некоторые связывающие ErbB-3 моноклональные антитела могут ингибировать пролиферацию и рост различных видов рака.

Другая стратегия включает связывание обоих рецепторов ErbB-2 и ErbB-3. Молекула MM-111 представляет собой искусственную биологическую молекулу, 10 содержащую два одноцепочечных фрагмента Fv (scFv), которые связывают ErbB-2 и ErbB-3. Два указанных scFv связаны с мутированным белком сывороточного альбумина человека (HSA) для увеличения времени полужизни молекулы. В доклиническом испытании показали, что данная молекула ингибирует передачу 15 сигналов ErbB-3 и пролиферацию. Данный эффект преимущественно был измерен на положительных по ErbB-3 линиях клеток, которые экспрессируют относительно большие количества ErbB-2.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 В соответствии с настоящим изобретением предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, и при этом указанное антитело способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанный первый сайт 25 связывания антигена предпочтительно присутствует в варибельном домене, содержащем цепь VH с последовательностью аминокислот цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (представляет собой гуманизированную MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (представляет собой гуманизированную MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001; 30 MF3003 или MF1898, изображенной на фигуре 16А или на фигуре 16Е. Указанный второй сайт связывания антигена предпочтительно присутствует в варибельном домене, содержащем цепь VH с последовательностью аминокислот цепи VH

MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенной на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37. Легкая цепь иммуноглобулина в 5  
вариабельном домене предпочтительно включает последовательность аминокислот, представленную на фигуре 16С.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой, если конкретно не указано иное, биспецифическое антитело. 10

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно настоящему изобретению.

15 Дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению, которое дополнительно содержит метку, предпочтительно метку для визуализации *in vivo*.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ 20  
лечения субъекта, содержащего положительную по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетку, включая вредную клетку, или опухоль, или субъекта, у которого есть риск развития указанной опухоли, включающий введение указанному субъекту биспецифического антитела согласно настоящему изобретению. Также предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению для 25  
применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ 30  
лечения индивида, у которого присутствует положительная по ErbB-2 опухоль или есть риск развития положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду нацеленного на ErbB-2 агента, включая ингибитор ErbB-2 или связывающий ErbB-

2 агент, например, бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

Также предложена комбинация нацеленного на ErbB-2 агента, включающая ингибитор ErbB-2 или связывающий ErbB-2 агент, например, бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, для применения в способе лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или риск развития указанной опухоли.

Дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая нацеленный на ErbB-2 агент, включая ингибитор ErbB-2 или связывающий ErbB-2 агент, например, бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

Также предложен набор из частей, включающий нацеленный на ErbB-2 агент, включая ингибитор ErbB-2 или связывающий ErbB-2 агент, например, бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который

может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

5 Также предложен способ лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду биспецифического антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

15 Также предложено биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, для применения для лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге.

20

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанное биспецифическое антитело снижает или может снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке.

30 В данной заявке термин «сайт связывания антигена» относится к сайту, предпочтительно присутствующему на биспецифическом антителе, которое способно связываться с антигеном, и полученному из него. Немодифицированный сайт связывания антигена обычно образован вариабельным доменом антитела и присутствует в нем. Вариабельный домен содержит указанный сайт связывания

антигена. Варибельный домен, который связывает антиген, представляет собой варибельный домен, содержащий сайт связывания антигена, который связывает указанный антиген.

5 В одном варианте реализации варибельный домен антитела согласно настоящему изобретению включает варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL). Сайт связывания антигена может присутствовать в объединенном варибельном домене VH/VL или только в области VH, или только в области VL. Если сайт связывания антигена присутствует только в одной из двух областей варибельного домена, то вторая варибельная область 10 может способствовать укладке и/или стабильности связывающей варибельной области, но не вносит значительный вклад в само связывание антигена.

В данной заявке связывание антигена относится к обычной способности антитела связываться с его антигеном. Антитело, содержащее сайт связывания антигена, который связывается с EgbB-2, связывается с EgbB-2 и, при прочих 15 равных условиях, по меньшей мере в 100 раз хуже связывается с гомологичными рецепторами EgbB-1 и EgbB-4 того же вида. Антитело, содержащее сайт связывания антигена, который связывается с EgbB-3, связывается с EgbB-3 и, при прочих равных условиях, не связывается с гомологичными рецепторами EgbB-1 и EgbB-4 того же вида. Учитывая, что семейство EgbB представляет собой семейство 20 рецепторов на поверхности клетки, связывание обычно оценивают на клетках, которые экспрессируют указанный(-е) рецептор(ы). Связывание антитела с антигеном можно оценить различными способами. Один способ состоит в инкубации антитела с антигеном (предпочтительно с клетками, экспрессирующими антиген), удалении не связавшегося антитела 25 (предпочтительно с помощью этапа промывки) и обнаружении связанного антитела посредством меченого антитела, которое связывается со связанным антителом.

Связывание антигена антителом обычно опосредуется комплементарными участками антитела и специфической трехмерной структурой как антигена, так и 30 варибельного домена, что позволяет данным двум структурам точно связаться друг с другом (взаимодействие, аналогичное взаимодействию замка и ключа), в противоположность произвольному неспецифическому прикреплению антител.

Так как антитело обычно распознает эпитоп антигена и так как такой эпитоп может также присутствовать в других соединениях, антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с ErbB-2 и/или ErbB-3, могут также распознавать другие белки, если такие другие соединения содержат тот же эпитоп.

- 5 Следовательно, термин «связывающий» не исключает связывания указанных антител с другим белком или белками, которые содержат тот же эпитоп. Такой(-ие) другой(-ие) белок(-ки) предпочтительно не является(-ются) белком человека. Сайт связывания антигена ErbB-2 и сайт связывания антигена ErbB-3, в соответствии с определением в настоящем изобретении, обычно не связываются с другими
- 10 белками на мембране клеток человека после его рождения, предпочтительно взрослого человека. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению обычно способно связывать ErbB-2 и ErbB-3 с аффинностью связывания, равной по меньшей мере  $1 \times 10^{-6}$  М, как указано более подробно ниже.

- Термин «препятствует связыванию» в данной заявке означает, что антитело
- 15 направлено на эпитоп на ErbB-3, и указанное антитело конкурирует с лигандом за связывание с ErbB-3. Антитело может ослаблять связывание лиганда, вытеснять лиганд, когда он уже связан с ErbB-3, или оно может, например, путем стерического препятствования, по меньшей мере частично предотвращать связывание данного лиганда с ErbB-3.

- 20 Термин «антитело» в данной заявке означает белковую молекулу, предпочтительно относящуюся к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более переменных доменов, которые связываются с эпитопом на антигене, при этом такие домены получены из переменного домена антитела или гомологичны ему по последовательности. Антитела для применения в терапии
- 25 предпочтительно настолько близки к природным антителам субъекта, которого лечат, насколько это возможно (например, человеческие антитела для людей). Связывание антитела можно выразить в понятиях специфичности и аффинности. Специфичность определяет, с каким антигеном или его эпитопом специфично связывается связывающий домен. Аффинность представляет собой меру силы
- 30 связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Специфическое связывание определяют как связывание с аффинностями (KD), равными по меньшей мере  $1 \times 10^{-6}$  М, более предпочтительно  $1 \times 10^{-7}$  М, более предпочтительно большими,

чем  $1 \times 10^{-9}$  М. Обычно, у антител для применения в терапии аффинности составляют до  $1 \times 10^{-10}$  М или больше. Антитела, такие как биспецифические антитела согласно настоящему изобретению, содержат константные домены (часть Fc) из природного антитела. Антитело согласно настоящему изобретению обычно  
5 представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело, предпочтительно из подкласса IgG человека. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению принадлежит подклассу IgG1 человека. Такие антитела согласно настоящему изобретению обладают хорошими свойствами в отношении АЗКЦ, у них наблюдается подходящее время полужизни после введения *in vivo* людям, и  
10 существует методика конструирования СНЗ, которая может позволить получить модифицированные тяжелые цепи, которые преимущественно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры при совместной экспрессии в клональных клетках.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой «полноразмерное» антитело. Термин «полноразмерный»  
15 согласно настоящему изобретению определен как включающий по существу полное антитело, которое, тем не менее, не обязательно обладает всеми функциями интактного антитела. Во избежание сомнений, полноразмерное антитело содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константные (С) и переменные (V) области, которые можно разделить на домены, обозначенные  
20 СН1, СН2, СН3, VH и CL, VL. Антитело связывается с антигеном посредством переменных доменов, содержащихся в части Fab, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы посредством константных доменов, по большей части через Fc-область. Термины «переменный домен», «пара VH/VL», «VH/VL» в данной заявке используют  
25 взаимозаменяемо. Полноразмерные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела, в которых могут присутствовать мутации, придающие желательные свойства. Такие мутации не должны представлять собой делеции существенных частей любой из областей. Тем не менее, антитела, из которых удален один или несколько аминокислотных остатков, по существу без изменения  
30 свойств связывания полученного в результате этого антитела, входят в объем термина «полноразмерное антитело». Например, в антителе IgG могут присутствовать вставки, делеции, или их комбинация, 1 - 20 аминокислотных

остатков в константной области. Например, активность АЗКЦ антитела можно улучшить, если само антитело проявляет низкую активность АЗКЦ, путем незначительной модификации константной области антитела (Junttila, T. T., K. Parsons и др. (2010). «Superior *In vivo* Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer.» *Cancer Research* 70(11): 4481-4489)

Полноразмерные антитела IgG предпочтительны благодаря их благоприятному времени полужизни и необходимости, чтобы они были близки к полностью аутологическим (человеческим) молекулам по причине иммуногенности. Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело IgG, предпочтительно биспецифическое полноразмерное антитело IgG1. IgG1 является предпочтительным благодаря его длительному времени полужизни в кровотоке человека. Для того чтобы предотвратить какую-либо иммуногенность у людей, предпочтительно, чтобы биспецифическое антитело IgG согласно настоящему изобретению представляло собой IgG1 человека.

Термин «биспецифическое» (бс) означает, что одна часть антитела (согласно определению выше) связывается с одним эпитопом на антигене, тогда как вторая часть связывается с отличным эпитопом. Указанный отличный эпитоп обычно присутствует на отличном антигене. Согласно настоящему изобретению указанные первый и второй антигены фактически представляют собой два различных белка. Предпочтительное биспецифическое антитело представляет собой антитело, которое содержит части двух различных моноклональных антител и, следовательно, связывается с двумя различными типами антигенов. Одно плечо биспецифического антитела обычно содержит переменный домен одного антитела и другое плечо содержит переменный домен другого антитела. Переменные области тяжелой цепи биспецифического антитела согласно настоящему изобретению обычно отличаются друг от друга, тогда как переменные области легкой цепи предпочтительно одинаковы в биспецифических антителах согласно настоящему изобретению. Биспецифическое антитело, в котором различные переменные области тяжелой цепи связаны с одной и той же, или общей, легкой цепью, также называют биспецифическим антителом с общей легкой цепью. Следовательно, дополнительно предложено

биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, в котором оба плеча содержат общую легкую цепь.

Предпочтительные биспецифические антитела можно получить путем совместной экспрессии двух различных тяжелых цепей и общей легкой цепи в  
5 одной клетке. Если используют домены СНЗ дикого типа, то совместная экспрессия двух различных тяжелых цепей и общей легкой цепи приведет к получению трех различных видов: АА, АВ и ВВ. Для увеличения процента желательного биспецифического продукта (АВ) можно применять конструирование СНЗ или, другими словами, можно применять тяжелые цепи с совместимыми доменами  
10 гетеродимеризации, как описано ниже.

Термин «совместимые домены гетеродимеризации» в данной заявке относится к доменам белка, которые сконструированы таким образом, что сконструированный домен А' будет преимущественно образовывать гетеродимеры со сконструированным доменом В' и наоборот, при этом снижена  
15 гомодимеризация между А'-А' и В'-В'.

Термин «общая легкая цепь» согласно настоящему изобретению относится к легким цепям, которые могут быть идентичны или могут содержать некоторые отличия в последовательности аминокислот, при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не нарушена. Например, возможно, в рамках объема  
20 определения общих легких цепей в данной заявке, получить или найти легкие цепи, которые неидентичны, но все же функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных замен аминокислот, замен аминокислот в участках, которые не вносят или вносят лишь частичный вклад в специфичность связывания при образовании пары с тяжелой цепью, и тому подобное. Все термины  
25 «общая легкая цепь», «общая VL», «одна легкая цепь», «одна VL», с добавлением или без термина «перестроенная», используют взаимозаменяемо в данной заявке. В некотором аспекте настоящего изобретения применяют в качестве общей легкой цепи человеческую легкую цепь, которую можно комбинировать с различными тяжелыми цепями с получением антител с функциональными связывающими  
30 антиген доменами (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant и др. 1998 и Nissim и др. 1994). Предпочтительно, общая легкая цепь имеет последовательность зародышевой линии. Предпочтительная последовательность зародышевой линии

представляет собой вариабельную область легкой цепи, которую часто используют в человеческом репертуаре и которая обладает хорошей термодинамической стабильностью, выходом и растворимостью. Предпочтительная легкая цепь зародышевой линии представляет собой O12, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 или ее фрагмент или функциональный эквивалент (т.е., тот же фрагмент гена IgVκ1-39, но отличный фрагмент гена IGJκ) (номенклатура согласно базе данных IMGT, сайт во всемирной сети [imgt.org](http://imgt.org)). Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, в котором

10 указанная общая легкая цепь представляет собой легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека, содержащую фрагмент гена IgVκ1-39, наиболее предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01. Термины перестроенная легкая цепь зародышевой линии каппа человека IgVκ1-

15 39\*01/IGJκ1\*01, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVκ1-39 или вкратце huVκ1-39 используют взаимозаменяемо во всем тексте настоящей заявки. Очевидно, что специалисты в данной области поймут, что термин «общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, последовательность аминокислот которых не идентична. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, в

20 которых присутствуют мутации (делеции, замены, вставки), которые существенно не влияют на образование функциональных связывающих областей. Легкая цепь согласно настоящему изобретению также может представлять собой легкую цепь согласно определению, приведенному выше в данной заявке, содержащую вставки, делеции, замены 1 - 5 аминокислот, или их комбинацию.

25 Также предложены антитела, в которых VH способна специфично распознавать первый антиген и VL, образующая пару с VH в вариабельном домене иммуноглобулина, способна специфично распознавать второй антиген. Полученная в результате этого пара VH/VL будет связываться либо с антигеном 1, либо с антигеном 2. Такие так называемые «антитела два в одном», описанные,

30 например, в WO 2008/027236, WO 2010/108127 и Schaefer и др. (Cancer Cell 20, 472-486, октябрь 2011 г.), отличаются от биспецифических антител согласно настоящему изобретению, и далее их называют антителами «два в одном». Такие

антитела «два в одном» содержат идентичные плечи и не являются антителами согласно настоящему изобретению.

Термин «ErbB-2» в данной заявке относится к белку, который у людей  
5 кодируется геном ERBB-2. Альтернативные названия данного гена или белка  
включают CD340; HER-2; HER-2/neu; MLN 19; NEU; NGL; TKR1. Ген ERBB-2  
часто называют HER2 (от рецептора эпидермального фактора роста 2 человека).  
Если в данной заявке упоминают ErbB-2, то такое упоминание относится к ErbB-2  
человека. Антитело, содержащее сайт связывания антигена, который связывает  
10 ErbB-2, связывается с ErbB-2 человека. Сайт связывания антигена ErbB-2,  
вследствие подобия последовательностей и третичных структур между ортологами  
из человека и других млекопитающих, может также связывать такой ортолог, но не  
обязательно. Номера доступа в базе данных для белка ErbB-2 человека и  
кодирующего его гена следующие: NP\_001005862.1, NP\_004439.2 NC\_000017.10  
15 NT\_010783.15 NC\_018928.2. Номера доступа прежде всего даны, чтобы  
обеспечить дополнительный способ идентификации ErbB-2 как мишени,  
фактическая последовательность белка ErbB-2, связанного с антителом, может  
изменяться, например, вследствие мутации в кодирующем гене, такой как  
встречающаяся при некоторых видах рака или тому подобная. Сайт связывания  
20 антигена ErbB-2 связывает ErbB-2 и различные его варианты, такие как варианты,  
экспрессируемые некоторыми положительными по ErbB-2 опухолевыми клетками.

Термин «связывающий ErbB-2 агент» в данной заявке относится к любой  
молекуле или соединению, способному связываться с ErbB-2. «Ингибитор ErbB-2»  
в данной заявке относится к любой молекуле или соединению, способному снижать  
25 или ослаблять, либо непосредственно, либо опосредованно, активность ErbB-2.  
Такой ингибитор может представлять собой низкомолекулярное соединение или  
может представлять собой биологический агент, например, антитело.

Термин «ErbB-3» в данной заявке относится к белку, который у людей  
кодируется геном ERBB-3. Альтернативные названия данного гена или белка  
30 включают HER3; LCCS2; MDA-BF-1; c-ErbB-3; c-erbb-3; erbb-3-S; p180-Erbb-3;  
p45-sErbb-3; и p85-sErbb-3. Если в данной заявке упоминают ErbB-3, то такое  
упоминание относится к ErbB-3 человека. Антитело, содержащее сайт связывания

антигена, который связывает ErbB-3, связывает ErbB-3 человека. Сайт связывания антигена ErbB-3, вследствие подобия последовательностей и третичных структур между ортологами из человека и других млекопитающих, может также связывать такой ортолог, но не обязательно. Номера доступа в базе данных для белка ErbB-3 человека и кодирующего его гена следующие: NP\_001005915.1 NP\_001973.2, NC\_000012.11 NC\_018923.2, NT\_029419.12. Номера доступа прежде всего даны, чтобы обеспечить дополнительный способ идентификации ErbB-3 как мишени, фактическая последовательность белка ErbB-3, связанного с антителом, может изменяться, например, вследствие мутации в кодирующем гене, такой как встречающаяся при некоторых видах рака или тому подобная. Сайт связывания антигена ErbB-3 связывает ErbB-3 и различные его варианты, такие как варианты, экспрессируемые некоторыми положительными по ErbB-2 опухолевыми клетками. Термин «связывающий ErbB-3 агент» в данной заявке относится к любой молекуле или соединению, способному связываться с ErbB-3. «Ингибитор ErbB-3» в данной заявке относится к любой молекуле или соединению, способному снижать или ослаблять, либо непосредственно, либо опосредованно, активность ErbB-3. Такой ингибитор может представлять собой антитело, например, патритумаб, ММ-121 (серибантумаб), лумретузумаб.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, может снижать или снижает вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. В присутствии избытка ErbB-2 гетеродимеры ErbB-2/ErbB-3 могут дать сигнал к росту экспрессирующей клетке в отсутствие детектируемого лиганда для ErbB-3 цепи в гетеродимере. Данную функцию рецептора ErbB-3 в данной заявке называют независимой от лиганда функцией рецептора ErbB-3. Гетеродимер ErbB-2/ErbB-3 также дает сигнал к росту экспрессирующей клетке в присутствии лиганда ErbB-3. Данную функцию рецептора ErbB-3 в данной заявке называют вызванной лигандом функцией рецептора ErbB-3.

Термин «лиганд ErbB-3» в данной заявке относится к полипептидам, которые связывают и активируют ErbB-3. Примеры лигандов ErbB-3 включают, но не ограничены перечисленными: нейрегулин 1 (NRG) и нейрегулин 2,

бетацеллюлин, связывающий гепарин эпидермальный фактор роста и эпирегулин. Данный термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты встречающегося в природе полипептида.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения  
5 вызванная лигандом функция рецептора ErbB-3 представляет собой вызванный лигандом ErbB-3 рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки. В предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку MCF-7 (ATCC® HTB-22™); клетку SKBR3 (ATCC® HTB-30™); клетку NCI-87 (ATCC® CRL-5822™); клетку VxPC-3-luc2 (Perkin Elmer 125058), клетку  
10 BT-474 (ATCC® HTB-20™) или клетку JIMT-1 (DSMZ №: ACC 589).

В предпочтительном варианте реализации положительная по ErbB-2 и ErbB-3 клетка содержит по меньшей мере 50000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности. В предпочтительном варианте реализации по меньшей мере 100000 рецепторов ErbB-2. В одном предпочтительном варианте реализации  
15 положительная по ErbB-2 и ErbB-3 клетка содержит по меньшей мере 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности. В другом предпочтительном варианте реализации положительная по ErbB-2 и ErbB-3 клетка содержит не более 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности. Используемые в настоящее время методы лечения, такие как трастузумаб (герцептин) и пертузумаб, назначают только  
20 пациентам со злокачественными положительными по ErbB-2 клетками, которые содержат более 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности, чтобы получить клинический ответ. Пациентов с положительными по ErbB-2 опухолевыми клетками с более чем 1000000 рецепторов ErbB-2 на их поверхности обычно классифицируют как ErbB-2 [+++]. Пациентов классифицируют, например,  
25 применяя иммуногистохимию или флуоресцентную гибридизацию *in situ*. HercepTest™ и/или HER2 FISH (pharm Dx™) оба реализуются на рынке компанией Dako Denmark A/S, и/или можно применять тест HERmark®, реализуемый на рынке компанией Monogram Biosciences. Трастузумаб и пертузумаб назначают только ErbB-2 [+++] пациентам, так как у пациентов с более  
30 низкими концентрациями ErbB-2 обычно не выявляют достаточного клинического ответа при лечении трастузумабом и пертузумабом. В настоящем изобретении, тем не менее, предложены биспецифические антитела, которые также проявляют

улучшенную аффинность связывания с клетками с более низкой концентрацией рецептора ErbB-2 по сравнению с трастузумабом. В примерах показано, что пролиферации таких клеток с более низкой экспрессией ErbB2 эффективно противодействуют с помощью антитела согласно настоящему изобретению. Такая

5 более низкая концентрация рецептора ErbB-2 присутствует на злокачественных клетках пациентов, которых классифицируют как ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+]. Также у рецидивировавших положительных по ErbB-2 опухолей часто концентрация рецептора ErbB-2 оказывается более низкой, чем 1000000 рецепторов на клетку. Таких ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+] пациентов, а также

10 пациентов с рецидивировавшей положительной по ErbB-2 опухолью, следовательно, предпочтительно лечат биспецифическим антителом согласно настоящему изобретению. Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает

15 ErbB-3, при этом указанное антитело может снижать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки, которая содержит менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности. Также предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть риск развития опухоли, при этом указанная опухоль

20 содержит на поверхности клетки менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на клетку, указанный способ включает введение указанному субъекту биспецифического антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Также в данной заявке предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого

25 присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, при этом указанная опухоль содержит на поверхности клетки менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на клетку. Указанное антитело согласно настоящему изобретению обычно способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3, предпочтительно вызванный лигандом рост, на

30 положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена,

который связывает домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по 5 ErbB-2 клетке, что более подробно объяснено ниже в данной заявке. Аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к 10 положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из 15 группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно 20 настоящему изобретению предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.

25

Для того чтобы установить, является ли опухоль положительной по ErbB-3, квалифицированный специалист может, например, определить амплификацию ErbB-3 и/или окрашивание ErbB-3 при иммуногистохимии. По меньшей мере 10% опухолевых клеток в биоптате должны быть положительными. Биоптат также 30 может содержать 20%, 30% 40% 50% 60% 70% или более положительных клеток.

В данной заявке вызванная лигандом функция рецептора снижается по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30, 40, 50 60 или по меньшей мере на 70%, в особенно предпочтительном варианте реализации вызванная лигандом функция рецептора снижается на 80, более предпочтительно на 90%. Указанное снижение предпочтительно определяют путем определения вызванной лигандом функции рецептора в присутствии биспецифического антитела согласно настоящему изобретению и ее сравнения с такой же функцией в отсутствие антитела при прочих равных условиях. Указанные условия включают по меньшей мере присутствие лиганда ErbB-3. Количество присутствующего лиганда предпочтительно представляет собой количество, которое вызывает половину максимального роста положительной по ErbB-2 и ErbB-3 линии клеток. Положительная по ErbB-2 и ErbB-3 линия клеток для данного теста предпочтительно представляет собой линию клеток MCF-7 (ATCC® HTB-22™), линию клеток SKBR3 линию клеток (ATCC® HTB-30™), линию клеток JIMT-1 (DSMZ ACC 589) или линию клеток NCI-87 (ATCC® CRL-5822™). Тест и/или лиганд для определения вызванной лигандом ErbB-3 функции рецептора предпочтительно представляет собой тест на вызванное лигандом ErbB-3 снижение роста, как описано в разделе Примеры.

Белок ErbB-2 содержит несколько доменов (для справки см. фигуру 1 в Landgraf, R Breast Cancer Res. 2007; 9(1): 202-). Внеклеточные домены называют доменами I - IV. Место связывания с соответствующими доменами сайтов связывания антигена на антителах, описанных в данной заявке, было картировано (см. примеры). Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению с сайтом связывания антигена (первым сайтом связывания антигена), который связывает домен I или домен IV ErbB-2 (первый сайт связывания антигена), содержит переменную область тяжелой цепи, которая сохраняет значительную специфичность связывания и аффинность к ErbB-2 в комбинации с различными легкими цепями. Было обнаружено, что биспецифические антитела с сайтом связывания антигена (первым сайтом связывания антигена), который связывает домен I или домен IV ErbB-2 (первый сайт связывания антигена), и с сайтом связывания антигена ErbB-3 (вторым сайтом связывания антигена) более эффективно снижают вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 по

сравнению с биспецифическим антителом, содержащим сайт связывания антигена (первый сайт связывания антигена), который связывается с другим внеклеточным доменом ErbB-2. Биспецифическое антитело, содержащее сайт связывания антигена (первый сайт связывания антигена), который связывает ErbB-2, при этом  
5   указанный сайт связывания антигена связывается с доменом I или доменом IV ErbB-2 является предпочтительным. Предпочтительно указанный сайт связывания антигена связывается с доменом IV ErbB-2. Обнаружили, что биспецифическое антитело с сайтом связывания антигена (первым сайтом связывания антигена), который связывает ErbB-2, и которое дополнительно вызывает АЗКЦ, более  
10   эффективно, чем другие связывающие ErbB-2 антитела, которые не проявляют значительную активность АЗКЦ, в частности, *in vivo*. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое проявляет АЗКЦ, следовательно, предпочтительно. Обнаружили, что антитела, в которых указанный первый сайт связывания антигена связывается с доменом IV ErbB-2, обладают собственной  
15   активностью АЗКЦ. Домен I, связывающий связывающее ErbB-2 антитело, которое обладает низкой собственной активностью АЗКЦ, можно сконструировать, чтобы повысить активность АЗКЦ. Fc-области опосредуют функцию антитела путем связывания с различными рецепторами на иммунных эффекторных клетках, таких как макрофаги, клетки-естественные киллеры, В-клетки и нейтрофилы. Некоторые  
20   из данных рецепторов, такие как CD16A (FcγRIIIA) и CD32A (FcγRIIA), активируют клетки, чтобы они сформировали ответ на антигены. Другие рецепторы, такие как CD32B, ингибируют активацию иммунных клеток. Путем конструирования Fc-областей (посредством введения замен аминокислот), которые связываются с активирующими рецепторами с большей селективностью, можно  
25   создать антитела, которые обладают большей способностью опосредовать виды цитотоксической активности, необходимые для противоракового МАТ.

Одной методикой увеличения АЗКЦ антитела является дефукозилирование (см. например, Junttila, T. T., K. Parsons и др. (2010). «Superior *In vivo* Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer.» *Cancer Research* 70(11): 4481-4489). Следовательно, дополнительно предложено  
30   биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое дефукозилировано. В качестве альтернативы или дополнения, можно использовать

множество других стратегий, чтобы добиться повышения АЗКЦ, например, включая гликоинженерию (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) и Eureka Therapeutics) и мутагенез (Xencor и MacroGenics), во всех из которых стараются увеличить связывание Fc с низкоаффинным активирующим FcγRIIIa и/или  
5 уменьшить связывание с низкоаффинным ингибиторным FcγRIIb.

Существует несколько способов *in vitro* для определения эффективности антител или эффекторных клеток в отношении индукции АЗКЦ. Среди данных способов есть анализы высвобождения хрома-51 [Cr51], анализы высвобождения  
10 европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S35]. Обычно меченую линию клеток-мишеней, экспрессирующую некоторый выставленный на поверхность антиген, инкубируют с антителом, специфичным к данному антигену. После промывки эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецептор CD16, обычно совместно инкубируют с мечеными антителом клетками-мишенями.  
15 Впоследствии обычно измеряют лизис клетки-мишени по высвобождению внутриклеточной метки, например, с помощью сцинтилляционного счетчика или спектрофотометрии. Предпочтительный анализ подробно описан в Примерах.

Одним преимуществом настоящего изобретения является тот факт, что связывание антител согласно настоящему изобретению, таких как, например,  
20 RB4188, с положительными по ErbB-2 и ErbB-3 клетками приводит к тому же уровню интернализации, как и применение трастузумаба. Если используют комбинацию трастузумаба и пертузумаба, то интернализация данных антител увеличивается. Такая повышенная интернализация, тем не менее, приводит к пониженной АЗКЦ. Антитело согласно настоящему изобретению, приводящее к  
25 интернализации по существу на том же уровне, что и трастузумаб, следовательно, является более предпочтительным, чем комбинация трастузумаба и пертузумаба, поскольку с таким антителом активность АЗКЦ лучше поддерживается.

Антитело согласно настоящему изобретению, содержащее сайт связывания  
30 антигена, который связывает ErbB-3, препятствует связыванию лиганда ErbB-3 с ErbB-3. Такие антитела более эффективно снижают вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на линии положительных по ErbB-2 и ErbB-3 клеток, особенно в

контексте биспецифического антитела, которое также содержит сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2.

В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения  
5 предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2. В примерах показано, что биспецифические антитела, обладающие  
10 данными свойствами, в достаточной мере способны связывать положительные по ErbB-2 и ErbB-3 клетки и противодействовать их активности (такой как вызванная лигандом функция рецептора ErbB-3 и вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB3 клетки). Более того, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению, содержащие первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, особенно подходят для применения в комбинации с  
15 существующими направленными против ErbB-2 методами лечения, такими как трастузумаб и пертузумаб, так как трастузумаб и пертузумаб связывают отличные домены ErbB-2. Трастузумаб связывает домен IV ErbB-2, и пертузумаб связывает домен II ErbB-2. Следовательно, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с доменом I ErbB-2, предпочтительны, так как  
20 они не конкурируют с трастузумабом и пертузумабом за один и тот же эпитоп.

В другом предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III  
25 ErbB-3. Такое антитело согласно настоящему изобретению особенно подходит для комбинированной терапии с применяемыми в настоящее время направленными против ErbB-3 связывающими молекулами, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (Merrimack Pharmaceuticals; также называют №Ab6) и RG7116 (Roche), которые связываются с доменом I ErbB-3, потому что тогда  
30 различные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

Предпочтительно предложено биспецифическое антитело, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III ErbB-3. Такое антитело особенно подходит для комбинированной терапии с направленными против ErbB-2 связывающими молекулами, которые не связывают домен I ErbB-2, такими как трастузумаб и пертузумаб, и с направленными против ErbB-3 связывающими молекулами, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (№Ab6) и RG7116.

В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III ErbB-3, и при этом указанное антитело способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело предпочтительно может уменьшать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки.

В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. В противоположность биспецифическим соединениям известного уровня техники, таким как, например, MM-111 от Merrimack Pharmaceuticals, которые обладают более высокой аффинностью к ErbB-2, чем к ErbB-3, в соответствии с настоящим изобретением предложены биспецифические антитела, которые содержат специфическое к ErbB-3 плечо с

аффинностью к ErbB-3 на клетках, которая больше, чем аффинность специфического к ErbB-2 плеча к ErbB-2 на клетках. Такие биспецифические антитела способны лучше связывать ErbB-3, несмотря на низкую концентрацию ErbB-3 на поверхности клетки. Это обеспечивает преимущество, состоящее в том, что функциональная активность против ErbB-3 повышена по сравнению с соединениями известного уровня техники, это означает, что данные биспецифические антитела согласно настоящему изобретению лучше способны противодействовать активности ErbB-3 (такой как вызванный лигандом рост).

10 В данной заявке термин «аффинность» относится к значению KD.

Аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к ErbB-3 на клетках SK-BR-3 ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 1,39 - 0,59 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к ErbB-3 на клетках BT-474 ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,0 нМ, более предпочтительно ниже, чем 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 0,31 - 0,15 нМ. Приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

Аффинность (KD) указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к ErbB-2 на клетках SK-BR-3 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,3 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 3,0 - 1,6 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к ErbB-2 на клетках BT-474 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 4,5 - 3,3 нМ. Приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

20

В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, при этом аффинность (KD) указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам BT-474 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,7 нМ, предпочтительно ниже или равна 3,2 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 3,7 - 2,7 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, при этом аффинность указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам SK-BR-3 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна

30

3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 2,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне от 2,4 - 1,6 нМ. Снова, приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке, и при этом указанное антитело способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело предпочтительно может уменьшать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки.

20

Приведенные выше антитела согласно настоящему изобретению с высокой аффинностью к ErbB-3 предпочтительно связывают домен I ErbB2 и/или домен III ErbB-3. Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Также предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3, при этом аффинность

30

указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. В особенно предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело  
5 согласно настоящему изобретению, которое содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3, при этом аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по  
10 отношению к положительной по ErbB-2 клетке.

Указанный второй сайт связывания антигена предпочтительно связывает домен III ErbB-3 и обладает аффинностью (KD) по отношению к положительной по ErbB-3 клетке, которая ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно  
15 ниже или равна 0,99 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III ErbB-3 и обладает аффинностью к ErbB-3 на клетках SK-BR-3, которая ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. В одном варианте реализации  
20 указанная аффинность находится в диапазоне 1,39 - 0,59 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III ErbB-3 и обладает аффинностью к ErbB-3 на клетках BT-474, которая ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,0 нМ, более предпочтительно  
25 ниже или равна 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 0,31 - 0,15 нМ.

Указанный первый сайт связывания антигена предпочтительно связывает  
30 домен I ErbB-2 и обладает аффинностью (KD) по отношению к положительной по ErbB-2 клетке, которая ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. В одном

предпочтительном варианте реализации указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и обладает аффинностью к ErbB-2 на клетках SK-BR-3, которая ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,3 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 3,0 - 1,6 нМ. Аффинность указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам SK-BR-3 предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,4 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне от 2,4 - 1,6 нМ.

В одном предпочтительном варианте реализации указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и обладает аффинностью (KD) к ErbB-2 на клетках BT-474, которая ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 4,5 - 3,3 нМ. Аффинность указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам BT-474 предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,7 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,2 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 3,7 - 2,7 нМ.

Снова, приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

30

В другом предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, содержащее

первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанное антитело может снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке, при этом указанное биспецифическое антитело значительно не влияет на выживаемость кардиомиоцитов.

Кардиотоксичность представляет собой известный фактор риска при нацеленных ErbB-2 методах лечения, и частота осложнений повышается, когда трастузумаб применяют в сочетании с антрациклинами, тем самым вызывая сердечный стресс. Например, комбинация доксицилина (DOX) с трастузумабом оказывает тяжелые побочные действия на сердце. В клинических исследованиях оценили, что у от 5% до 10% пациентов, которые получают трастузумаб в сочетании с адьювантом для лечения рака молочной железы, развивается дисфункция сердца (Guarneri и др., J Clin Oncol., 1985, 3:818-26; Ewer MS и др., Nat Rev Cardiol 2010;7:564-75). Тем не менее в ретроспективном исследовании продемонстрировали, что риск развития асимптоматической дисфункции сердца фактически доходит до приблизительно 25%, когда трастузумаб применяют в адьювантной схеме с DOX (Wadhwa и др., Breast Cancer Res Treat 2009;117:357-64). В примерах показано, что в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, которые нацелены на ErbB-2 и которые не влияют или в значительно меньшей степени влияют на выживаемость кардиомиоцитов по сравнению с трастузумабом и пертузумабом. Они дают существенное преимущество, поскольку кардиотоксичность снижается. Это уже является преимуществом для людей, которые не страдают от сердечной недостаточности, и является еще большим преимуществом для людей, которые уже страдают от сердечной недостаточности или у которых есть риск ее развития, таких как, например, субъекты, страдающие от застойной сердечной недостаточности (ЗСН), дисфункции левого желудочка (ДЛЖ) и/или сниженной на  $\geq 10\%$  фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), и/или субъекты, у которых был инфаркт миокарда. Антитела согласно настоящему изобретению, которые значительно не влияют на выживаемость кардиомиоцитов, следовательно, предпочтительны. *In vitro* функцию кардиомиоцитов, например, измеряют путем определения жизнеспособности кардиомиоцитов, путем определения BNP (натрийуретического пептида типа В, который представляет собой кардиальный биомаркер), путем

определения удлинения QT и/или путем определения потенциала митохондриальной мембраны.

Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и  
5 второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. В одном варианте реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению, которое значительно не влияет на выживаемость кардиомиоцитов, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом аффинность указанного  
10 второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно  
15 ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело,  
20 которое значительно не влияет на выживаемость кардиомиоцитов, содержит:  
- по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926,  
25 MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более  
30 предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от перечисленных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи; и/или

- по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от перечисленных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи. В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело представляет собой PB4188.

15

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело согласно настоящему изобретению, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере один аминокислотный остаток домена I ErbB-2, выбранный из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181. Нумерация аминокислотных остатков соответствует таковой для идентификационного номера 1S78 в базе данных Protein Data Bank (PDB). В примерах показано, что антитела, связывающие данную область домена I ErbB-2, проявляют особенно хорошие свойства связывания, и они способны противодействовать активности положительных по ErbB-2 клеток (такой как вызванная лигандом функция рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке, и/или вызванный лигандом рост такой клетки). Более того, такие антитела особенно подходят для комбинированной терапии с известными на сегодняшний день моноклональными антителами против ErbB-2, такими как

30

трастузумаб (которое связывает домен IV ErbB-2) и пертузумаб (которое связывает домен II ErbB-2), потому что они связываются с отличными доменами ErbB-2. Следовательно, данные антитела можно применять одновременно без конкурирования за один и тот же эпитоп. Термин «выставленные на поверхность

5 аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181» относится к аминокислотным остаткам, которые в первичной последовательности аминокислот расположены в пределах приблизительно первых пяти аминокислотных остатков, расположенных рядом с перечисленными остатками, и

10 которые по меньшей мере частично выставлены наружу белка, так что с ними могут связаться антитела (см., например, фигуру 21B). Предпочтительно, указанный аминокислотный остаток, расположенный в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181, выбран из группы, состоящей из L139, C140, Y141, Q142, D143, I145, L146, W147, K148,

15 D149, L159, T160, L161, I162, D163, N165, S167, R168, A169, C170, H171, C173, S174, P175, M176, C177, K178, C182, W183, G184, E185 и S186. Предпочтительно, указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 аминокислотных остатка домена I ErbB-2, выбранных из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и

20 выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, при этом указанное

25 антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере T144, R166 и R181 домена I ErbB-2. В другом варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, при этом указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере T144, R166, P172, G179 и R181 домена I ErbB-2. В другом варианте реализации

30 предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, при этом указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181 домена I ErbB-2.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанное антитело

5 содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3. Нумерация аминокислотных остатков соответствует таковой для идентификационного номера 4P59 в Protein

10 Data Bank (PDB). В примерах показано, что антитела, связывающие данную область домена III ErbB-3, проявляют особенно хорошие свойства связывания, и они способны противодействовать активности положительных по ErbB-3 клеток (такой как вызванная лигандом функция рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке и/или вызванный лигандом рост такой клетки). Термин

15 «выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3» относится к аминокислотным остаткам, которые в третичной структуре белка ErbB-3 пространственно расположены в пределах 11,2 Å от R426 и которые по меньшей мере частично выставлены наружу белка, так что с ними могут связаться антитела.

20 Предпочтительно указанные аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3, выбраны из группы, состоящей из L423, Y424, N425, G427, G452, R453, Y455, E480, R481, L482, D483 и K485 (см., например, фигуру 21С и таблицу 15). В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему

25 изобретению, при этом указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере R426 домена III ErbB-3. Предпочтительно, указанное антитело содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере R426 домена III ErbB-3.

30 Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно дефукозилировано, чтобы повысить активность АЗКЦ. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно

демонстрирует пониженную степень фукозилирования N-связанной углеводной структуры в Fc-области по сравнению с тем же антителом, полученным в нормальной клетке СНО.

5 Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют у людей. Для этой цели биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

10 Переносимость человеком полипептида обуславливается многими различными аспектами. Иммуитет, будь то опосредованный Т-клетками, опосредованный В-клетками или другой иммуитет, является одним из параметров, которые определяют переносимость человеком полипептида. Константная область биспецифического антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой человеческую константную область. Константная область может содержать одно или более, предпочтительно 15 не более 10, предпочтительно не более 5 отличий в аминокислотах от константной области встречающегося в природе антитела человека. Предпочтительно, чтобы константная часть была полностью получена из встречающегося в природе антитела человека. Различные антитела, полученные в данной заявке, получены из библиотеки переменных доменов антител человека. Соответственно, данные 20 переменные домены – человеческие. Уникальные участки CDR могут быть получены из людей, быть синтетическими или могут быть получены из другого организма. Переменную область считают человеческой переменной областью, если она имеет последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот переменной области встречающегося в 25 природе антитела человека, за исключением участка CDR. Переменная область связывающей E<sub>H</sub>B-2 V<sub>H</sub>, связывающей E<sub>H</sub>B-3 V<sub>H</sub> или легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 отличий в аминокислотах от переменной области встречающегося в природе антитела 30 человека, не считая возможных различий в последовательности аминокислот участков CDR. Такие мутации также встречаются в природе в контексте соматической гипермутации.

Антитела можно получить из различных видов животных, по меньшей мере в отношении вариабельной области тяжелой цепи. Распространенной практикой является гуманизирование таких, например, вариабельных областей тяжелой цепи мыши. Существуют различные способы, с помощью которых можно этого  
5 добиться, среди которых: прививка CDR на человеческую вариабельную область тяжелой цепи с 3D-структурой, которая соответствует 3D-структуре вариабельной области тяжелой цепи мыши; деиммунизация вариабельной области тяжелой цепи мыши, предпочтительно осуществляемая путем удаления известных или предполагаемых Т- или В-клеточных эпитопов из вариабельной области тяжелой  
10 цепи мыши. Удаление обычно происходит путем замены одной или более аминокислот в эпитопе на другую (обычно консервативную) аминокислоту, так что последовательность эпитопа оказывается модифицированной таким образом, что она более не является Т- или В-клеточным эпитопом.

Такие деиммунизированные вариабельные области тяжелой цепи мыши  
15 менее иммуногенны у людей, чем исходная вариабельная область тяжелой цепи мыши. Предпочтительно вариабельная область или домен согласно настоящему изобретению дополнительно гуманизирован, например, венирован. Путем применения методик вениринга внешние остатки, которые легко обнаруживаются иммунной системой, избирательно заменяют на человеческие остатки с  
20 получением гибридной молекулы, которая содержит либо слабо иммуногенную, либо по существу неиммуногенную венированную поверхность. Животное, используемое в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно примата, наиболее предпочтительно человека.

25

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит константную область из антитела человека. В соответствии с различиями в их константных доменах тяжелой цепи, антитела группируют по пяти классам или изотипам: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Данные  
30 классы или изотипы содержат по меньшей мере одну из указанных тяжелых цепей, которую называют соответствующей греческой буквой. В предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено

антитело согласно настоящему изобретению, в котором указанная константная область выбрана из группы, состоящей из константных областей IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, более предпочтительно указанная константная область включает константную область IgG, более предпочтительно константную область IgG1, 5 предпочтительно мутированную константную область IgG1. Некоторый вариант константной области IgG1 встречается в природе, такой как, например, аллотипы G1m1, 17 и G1m3, и/или допускается без изменения иммунологических свойств полученного в результате этого антитела. Обычно в константной области 10 допускается приблизительно 1 - 10 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинация.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает ErbB-2, при этом 15 указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или при этом 20 указанное антитело содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 25 16Е. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958.

Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к ErbB-2 вариабельной 30 области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре

16А или на фигуре 16Е, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958.

10

В соответствии с настоящим изобретением также предложено антитело, содержащее переменный домен, который связывает ErbB-3, при этом указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-3 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37, или при этом указанное антитело содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178.

Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к ErbB-3 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060;

30

MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена включает по меньшей мере последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16A или на фигуре 16E, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16A или на фигуре 16E, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070;

MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3

5 VH, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Указанный первый сайт связывания антигена предпочтительно

10 содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958, и указанный второй сайт связывания антигена предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее

15 предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178.

Указанный первый сайт связывания антигена предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к EgbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991,

20 MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16A или на фигуре 16E, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973,

25 MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898, и указанный второй сайт связывания антигена предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к EgbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307;

30 MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре

37, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенной на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Указанный первый сайт связывания антигена предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, и указанный второй сайт связывания антигена предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958, или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из MF3958, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178 или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из MF3178.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает

ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной  
5 аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от  
10 последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по  
15 меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958 и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено  
20 биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере  
25 последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

Последовательности CDR, например, изменяют с целью оптимизации, предпочтительно, чтобы улучшить эффективность связывания или стабильность антитела. Оптимизацию, например, осуществляют с помощью процедур  
30 мутагенеза, после чего предпочтительно исследуют стабильность и/или аффинность связывания полученного в результате этого антитела и предпочтительно выбирают улучшенную специфичную к ErbB-2 или ErbB-3

последовательность CDR. Квалифицированный специалист вполне способен создать варианты антитела, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR согласно настоящему изобретению. Например, применяется консервативная замена аминокислоты. Примеры консервативной замены аминокислоты включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, например, замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамина на аспарагин.

10

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает EгbV-2, при этом цепь VH указанного вариабельного домена включает последовательность аминокислот цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (представляет собой гуманизованную MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (представляет собой гуманизованную MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенную на фигуре 16А или на фигуре 16Е; или включает последовательность аминокислот цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (представляет собой гуманизованную MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (представляет собой гуманизованную MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенную на фигуре 16А или на фигуре 16Е, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно упомянутой выше последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16А или фигуре 16Е. Цепь VH вариабельного домена, который связывает EгbV-2, предпочтительно включает последовательность аминокислот:

25

- MF1849; или

30 - MF2971 или ее гуманизованный вариант, при этом указанный гуманизованный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или

- MF3004 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3991;

изображенную на фигуре 16А. В одном варианте реализации цепь VH

5 варьируемого домена, который связывает ErbB-2, включает последовательность аминокислот цепи VH - MF1849; или MF2971 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно

10 включает последовательность аминокислот MF3991, при этом перечисленные последовательности VH содержат не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно соответствующей последовательности, изображенной на фигуре 16А. В предпочтительном варианте

15 реализации цепь VH варьируемого домена, который связывает ErbB-2, включает последовательность аминокислот MF3958; или включает последовательность аминокислот MF3958, изображенную на фигуре 16А, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно

20 последовательности цепи VH. Антитело, содержащее варьируемый домен, который связывает ErbB-2, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, которое предпочтительно дополнительно содержит варьируемый домен, который связывает ErbB-3. Цепь VH варьируемого домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH:

25 MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37; или включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099;

30 MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16В, или на фигуре 16Е,

или на фигуре 37, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Цепь VH

5  
вариабельного домена, который связывает Erb-B3, предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или включает последовательность аминокислот MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно самое большее 1, 2, 3, 4 или 5

10  
вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно соответствующей последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B или фигуре 37. В предпочтительном варианте реализации цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-3, включает последовательность аминокислот MF3178; или включает последовательность аминокислот MF3178, изображенную

15  
на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH. Предпочтительно, приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот не находятся в участке CDR3. Приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот также предпочтительно не находятся в участках CDR1 и CDR2.

20  
Приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот также предпочтительно не находятся в области FR4.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело,

25  
содержащее вариабельный домен, который связывает ErbB-3, при этом цепь VH указанной вариабельной области включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074,

30  
изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062;

MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен

5 аминокислот, или их комбинацию, относительно указанной последовательности цепи VH. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, MF3176, MF3163, MF6058,

10 MF6061 или MF6065, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно указанной последовательности цепи VH. В предпочтительном варианте реализации цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, включает последовательность аминокислот

15 цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B; или включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH. Антитело,

20 содержащее переменный домен, который связывает ErbB-3, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, которое предпочтительно дополнительно содержит переменный домен, который связывает ErbB-2. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-2, предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH, изображенную на фигуре 16A или

25 фигуре 16E. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-2, предпочтительно включает последовательность аминокислот MF1849; или MF2971 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант

30 предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3991, изображенную на фигуре 16A. В одном варианте реализации перечисленные связывающие ErbB-2 последовательности VH содержат не более 15,

предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно соответствующей последовательности, изображенной на фигуре 16А. В одном предпочтительном варианте реализации указанная связывающая ErbB-2 цепь VH, изображенная на фигуре 16А, включает последовательность аминокислот MF3958; или включает последовательность аминокислот MF3958, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH. Предпочтительно, приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот не находятся в участке CDR3. Приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот также предпочтительно не находятся в участках CDR1 и CDR2. Приведенные выше вставки, делеции и замены аминокислот также предпочтительно не находятся в области FR4.

Дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению, при этом указанное антитело содержит специфичную к ErbB-2 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи: MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или при этом указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно самое большее 1, 2, 3, 4 или 5, аминокислотами от последовательностей вариабельной области тяжелой цепи MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898.

Дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению, при этом указанное антитело содержит специфичную к ErbB-3 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи: MF3178; MF3176;

MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенной на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или при этом указанное антитело содержит  
5 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно самое большее 1, 2, 3, 4 или 5, аминокислотами от последовательностей вариабельной области тяжелой цепи MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063;  
10 MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-2, при этом по меньшей мере один из указанных сайтов связывания антигена  
15 связывает домен I ErbB-2. Предпочтительно оба сайта связывания антигена связывают домен I ErbB-2. Такое антитело согласно настоящему изобретению особенно подходит для комбинированной терапии с применяемыми в настоящее время направленными против ErbB-2 связывающими молекулами, которые не связывают домен I ErbB-2, такими как трастузумаб, который связывает домен IV  
20 ErbB-2, и пертузумаб, который связывает домен II ErbB-2, потому что тогда различные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

Дополнительно предложено антитело, содержащее два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-2, при этом по меньшей мере один из  
25 указанных сайтов связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и при этом аффинность (KD) указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. Предпочтительно оба сайта связывания антигена связывают домен I ErbB-  
30 2. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена к ErbB-2 на клетках SK-BR-3 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более

предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,3 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 3,0 - 1,6 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена к ErbB-2 на клетках BT-474 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 4,5 - 3,3 нМ.

10           Приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

15

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело, содержащее два переменных домена, которые связываются с ErbB-2, при этом цепь VH указанных переменных доменов включает последовательность аминокислот цепи VH: MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (представляет собой гуманизованную MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (представляет собой гуманизованную MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенную на фигуре 16А или на фигуре 16Е; или последовательность аминокислот цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (представляет собой гуманизованную MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (представляет собой гуманизованную MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898 VH-цепи, изображенную на фигуре 16А или на фигуре 16Е, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно соответствующей последовательности, изображенной на фигуре 16А или на фигуре 16Е. Указанный VH предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH - MF1849; или MF2971 или ее

гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3991, 5 изображенную на фигуре 16А; или включает последовательность аминокислот цепи VH - MF1849; или MF2971 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант предпочтительно 10 включает последовательность аминокислот MF3991, изображенную на фигуре 16А, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно соответствующей последовательности, изображенной на фигуре 16А. Вариабельные домены антитела предпочтительно 15 содержат идентичные цепи VH, предпочтительно имеющие последовательность, изображенную на фигуре 16А или на фигуре 16Е. Антитело с вариабельными доменами с идентичными цепями VH не является биспецифическим антителом. Цепи VH идентичны в настоящем изобретении, если они включают ту же последовательность цепи VH, которая изображена на фигуре 16А, или на фигуре 20 16Е, или на фигуре 37, или ту же последовательность цепи VH, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или, их комбинации, относительно соответствующей последовательности, изображенной на фигуре 16А, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37.

25 В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-3, при этом по меньшей мере один из указанных сайтов связывания антигена связывает домен III ErbB-3. Предпочтительно оба сайта связывания антигена связывают домен III ErbB-3. Такое антитело согласно настоящему изобретению 30 особенно подходит для комбинированной терапии с применяемыми в настоящее время направленными против ErbB-3 связывающими молекулами, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (№Ab6) и RG7116, которые

связываются с доменом I ErbB-3, потому что тогда различные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

5 Дополнительно предложено антитело, содержащее два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-3, при этом по меньшей мере один из указанных сайтов связывания антигена связывает домен III ErbB-3, и при этом аффинность (KD) указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке ниже или равна 2,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 10 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Предпочтительно оба сайта связывания антигена связывают домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена к ErbB-3 на клетках SK-BR-3 ниже или равна 2,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 15 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 1,39 - 0,59 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность указанного по меньшей мере одного сайта связывания антигена к ErbB-3 на клетках BT-474 ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 20 или равна 1,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. В одном варианте реализации указанная аффинность находится в диапазоне 0,31 - 0,15 нМ.

25 Снова, приведенные выше аффинности предпочтительно измерены путем измерения аффинности клетки в стационарном состоянии, при этом клетки инкубируют при 4°C, применяя меченое радиоактивной меткой антитело, после чего измеряют связанную с клеткой радиоактивность, как описано в разделе Примеры.

30 Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело, содержащее два переменных домена, каждый из которых связывает ErbB-3, при этом VH указанных переменных доменов включает последовательность

аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37;

5 или включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно

10 любой из указанных последовательностей цепи VH. Указанная VH предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178, MF3176, MF3163, MF6058,

15 MF6061 или MF6065, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно любой из указанных последовательностей цепи VH. Указанный VH предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178; или включает

20 последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH - MF3178.

Вариабельные домены антитела предпочтительно содержат идентичные цепи VH, предпочтительно имеющие последовательность, изображенную на фигуре 16B, или

25 на фигуре 16E, или на фигуре 37. Антитело с вариабельными доменами с идентичными цепями VH не является биспецифическим антителом. Цепи VH идентичны, если они содержат одинаковую последовательность цепи VH, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или

30 одинаковую последовательность цепи VH, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинации, относительно

последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37.

Моноспецифические антитела согласно настоящему изобретению, которые  
5 специфичны к ErbB-3, обладают преимуществом, состоящим в том, что у них  
лучшая функциональная активность против ErbB-3 по сравнению с соединениями  
известного уровня техники, такими как, например, MM-121 (№Ab6), это означает,  
что данные антитела согласно настоящему изобретению способны лучше  
противодействовать активности ErbB-3 (такой как вызванная лигандом функция  
10 рецептора ErbB-3 и/или вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и  
ErbB-3 клетки). Это, например, показано в таблице 7 и на фигуре 38.

В предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим  
изобретением предложено биспецифическое антитело, содержащее переменный  
15 домен, который связывает ErbB-2, при этом цепь VH указанного переменного  
домена включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF1849; или MF2971 или ее  
гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант  
предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004  
20 или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант  
предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3991,  
изображенную на фигуре 16A; или включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF1849 или MF2971 или ее  
гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант  
25 предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3958; или MF3004  
или ее гуманизированный вариант, при этом указанный гуманизированный вариант  
предпочтительно включает последовательность аминокислот MF3991,  
изображенную на фигуре 16A, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3,  
4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок,  
30 делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно указанного VH.  
Такое биспецифическое антитело согласно данному варианту реализации  
дополнительно предпочтительно содержит переменный домен, который

связывает ErbB-3. Цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или наиболее предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно любой из указанных последовательностей цепи VH на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, или включает последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B.

В настоящем изобретении предпочтительно предложено биспецифическое антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает ErbB-2, и вариабельный домен, который связывает ErbB-3, при этом цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-2, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3958, изображенную на фигуре 16A; или
- последовательность аминокислот цепи VH - MF3958, изображенную на фигуре 16A, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно указанной VH; и

при этом цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-3, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B; или
- последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B.

В настоящем изобретении предпочтительно предложено биспецифическое антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает ErbB-2, и вариабельный домен, который связывает ErbB-3,

при этом цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-2, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3991, изображенную на фигуре 16A; или
- последовательность аминокислот цепи VH - MF3991, изображенную на фигуре 16A, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно указанной VH; и

при этом цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-3, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B; или
- последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16B, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B.

При сравнении с последовательностями на фигуре 16, поведение цепи VH обычно начинает заметно отличаться, когда она содержит более 15 замен аминокислот относительно последовательности аминокислот цепи VH, изображенной на фигуре 16. Цепь VH, содержащая не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, замен аминокислот, или их

комбинацию, относительно цепи VH, изображенной на фигуре 16, предпочтительно содержит 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно цепи VH, изображенной на фигуре 16, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен, или их комбинацию, 5 предпочтительно 1, 2 или 3 вставки, делеции, замены, или их комбинацию, более предпочтительно 1 или 2 вставки, делеции, замены, или их комбинацию, и предпочтительно 1 вставку, делецию, замену, или их комбинацию, относительно цепи VH, изображенной на фигуре 16. Указанные одна или более вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинация, предпочтительно находятся не в участке CDR1, CDR2 и CDR3 цепи VH. Они также предпочтительно не находятся в области FR4. Замена аминокислоты предпочтительно представляет собой консервативную замену аминокислоты. 10

В предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено биспецифическое антитело, включающее 15 последовательность аминокислот, изображенную на фигуре 16D, или биспецифическое антитело на фигуре 16D, содержащее не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности на фигуре 16D, при этом указанные не более 15, 20 предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен аминокислот предпочтительно представляют собой консервативные замены аминокислот. Указанные вставки, делеции, замены аминокислот, или их комбинация, предпочтительно находятся не в участке CDR3 цепи VH, предпочтительно не в участке CDR1, CDR2 и CDR3 цепи 25 VH, и предпочтительно не в области FR4.

Разработаны рациональные способы минимизации содержания не относящихся к человеку остатков в человеческом контексте. Доступны различные способы успешного переноса (прививки) свойства связывания антигена от 30 биспецифического антитела на другое антитело. Свойства связывания антител преимущественно определяются точной последовательностью участка CDR3, часто дополнительный вклад в них вносят последовательности участков CDR1 и

CDR2 в вариабельном домене, в сочетании с подходящей структурой вариабельного домена как целого. В настоящее время доступны различные способы прививки участков CDR на подходящий вариабельный домен другого антитела. Обзор некоторых из данных способов представлен в J.C. Almagro и J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, который включен в данную заявку посредством ссылки. Следовательно, в настоящем изобретении дополнительно предложено человеческое или гуманизированное биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом вариабельный домен, содержащий сайт связывания ErbB-2, включает последовательность CDR3 VH, изображенную на фигуре 16A или на фигуре 16E, и при этом вариабельный домен, содержащий сайт связывания ErbB-3, содержит участок CDR3 VH, изображенный на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания ErbB-2, предпочтительно включает последовательность участка CDR1, участка CDR2 и участка CDR3 цепи VH, изображенную на фигуре 16A или на фигуре 16E. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания ErbB-3, предпочтительно включает последовательность участка CDR1, участка CDR2 и участка CDR3 цепи VH, изображенную на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Прививку CDR также можно применять для получения цепи VH с участками CDR из VH, изображенной на фигуре 16 или фигуре 37, но содержащей отличный каркас. Указанный отличный каркас может быть получен из другой VH человека или из отличного млекопитающего.

Упомянутые не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен аминокислот предпочтительно представляют собой консервативные замены аминокислот. Указанные вставки, делеции, замены аминокислот, или их комбинация, предпочтительно находятся не в участке CDR3 цепи VH, предпочтительно не в участке CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VH и предпочтительно не в области FR4.

30

Легкая цепь вариабельного домена, содержащего последовательность вариабельной области тяжелой цепи, изображенную на фигуре 16 или фигуре 37,

- предпочтительно представляет собой легкую цепь зародышевой линии O12, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 или ее фрагмент или функциональное производное (номенклатура согласно базе данных IMGT, адрес в сети Интернет [imgt.org](http://imgt.org)).
- 5 Используют термины перестроенная легкая цепь зародышевой линии каппа человека IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVκ1-39 или вкратце huVκ1-39. Легкая цепь может содержать 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинацию. Упомянутые 1, 2, 3, 4 или 5 замен аминокислот предпочтительно представляют собой консервативные замены
- 10 аминокислот, указанные вставки, делеции, замены аминокислот, или их комбинация, предпочтительно находятся не в участке CDR3 цепи VL, предпочтительно не в участке CDR1, CDR2 или CDR3 или области FR4 цепи VL.

- Доступны различные способы получения биспецифических антител. Один
- 15 способ включает экспрессию двух различных тяжелых цепей и двух различных легких цепей в клетке и сбор антитела, которое продуцируется клеткой. Антитело, полученное таким способом, как правило, будет включать набор антител с различными комбинациями тяжелых и легких цепей, некоторые из которых представляют собой желательное биспецифическое антитело. Биспецифическое
- 20 антитело впоследствии можно очистить из указанного набора. Долю биспецифического антитела к другим антителам, которые продуцируются клеткой, можно увеличить различными способами. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанную долю увеличивают путем экспрессии, вместо двух различных легких цепей, двух по существу идентичных
- 25 легких цепей в клетке. Эту концепцию в данной области также называют методом «общей легкой цепи». Когда по существу идентичные легкие цепи работают вместе с двумя различными тяжелыми цепями, позволяя образование переменных доменов с различными сайтами связывания антигена и сопутствующими различными свойствами связывания, доля биспецифического антитела к другому
- 30 антителу, которое продуцируется клеткой, значительно увеличивается по сравнению с таковой при экспрессии двух различных легких цепей. Долю биспецифического антитела, которое продуцируется клеткой, можно

дополнительно увеличить путем стимуляции образования пары двух различных тяжелых цепей друг с другом вместо образования пары двух идентичных тяжелых цепей. В области описаны различные способы, которыми можно добиться такой гетеродимеризации тяжелых цепей. Одним способом является получение

5 биспецифических антител «выступ-во-впадину». См. заявку на патент США 20030078385 (Arathoon и др. - Genentech). Другой и предпочтительный способ описан в предварительной заявке на патент США 61/635935, после которой следовала обычная заявка на патент США № 13/866747 и заявка РСТ № РСТ/NL2013/050294 (WO 2013/157954 A1), которые включены в данную заявку

10 посредством ссылки. Описаны способы и средства получения биспецифических антител из одной клетки, в соответствии с которыми предложены средства, которые способствуют образованию биспецифических антител вместо образования моноспецифических антител. Данные способы также можно выгодно использовать в настоящем изобретении. Таким образом, в соответствии с настоящим

15 изобретением предложен способ получения биспецифического антитела согласно настоящему изобретению (из одной клетки), в котором указанное биспецифическое антитело содержит два домена СН3, которые способны образовывать область взаимодействия, указанный способ включает предоставление в указанной клетке а) первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей содержащую 1ый домен СН3

20 тяжелую цепь, б) второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей содержащую 2ой домен СН3 тяжелую цепь, при этом указанные молекулы нуклеиновой кислоты снабжены средствами для предпочтительного образования пары между указанными содержащими 1ый и 2ой домены СН3 тяжелыми цепями, указанный способ дополнительно включает этап культивирования указанной

25 клетки-хозяина, обеспечения возможности экспрессии указанных двух молекул нуклеиновых кислот и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Указанные первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот могут быть частью одной молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или носителя для доставки генов и могут быть встроены в один и тот же сайт генома клетки-хозяина. В качестве

30 альтернативы, указанные первую и вторую молекулы нуклеиновых кислот вводят в указанную клетку отдельно.

В предпочтительном варианте реализации предложен способ получения биспецифического антитела согласно настоящему изобретению (из одной клетки), в котором указанное биспецифическое антитело содержит два домена СН3, которые способны образовывать область взаимодействия, указанный способ  
5 включает предоставление:

- клетки, содержащей а) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания антигена, который связывает EgbV-2 и который содержит 1ый домен СН3, и б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания  
10 антигена, который связывает EgbV-3 и который содержит 2ой домен СН3, при этом указанные молекулы нуклеиновой кислоты снабжены средствами для предпочтительного образования пары между указанными 1ым и 2ым доменами СН3,

указанный способ дополнительно включает этап культивирования  
15 указанной клетки, обеспечения возможности экспрессии указанных двух молекул нуклеиновых кислот и сбора указанного биспецифического антитела IgG из культуры. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка также содержит третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую общую легкую цепь. Указанные первая, вторая и третья молекулы нуклеиновых кислот  
20 могут быть частью одной молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или носителя для доставки генов и могут быть встроены в один и тот же сайт генома клетки-хозяина. В качестве альтернативы, указанные первую, вторую и третью молекулы нуклеиновых кислот вводят в указанную клетку отдельно. Предпочтительная  
25 общая легкая цепь представляет собой O12, предпочтительно перестроенную легкую цепь зародышевой линии каппа IgVκ1 39\*01/IGJκ1\*01 человека, описанную выше. Средства для предпочтительного образования пары между указанным 1ым и указанным 2ым доменами СН3 предпочтительно представляют собой соответствующие мутации в областях, кодирующих домен СН3 тяжелой  
30 цепи. Предпочтительные мутации для получения по существу только биспецифических антител представляют собой замены аминокислот L351K и T366K (нумерация по Кабату) в первом домене СН3 и замены аминокислот L351D и L368E во втором домене СН3, или наоборот. Следовательно, дополнительно

предложен способ согласно настоящему изобретению для получения биспецифического антитела, в котором указанный первый домен СНЗ содержит замены аминокислот L351K и T366K (нумерация по Кабату), и в котором указанный второй домен СНЗ содержит замены аминокислот L351D и L368E,

5 указанный способ дополнительно включает этап культивирования указанной клетки, обеспечения возможности экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Также предложен способ согласно настоящему изобретению для получения биспецифического антитела, в котором указанный первый домен СНЗ содержит

10 замены аминокислот L351D и L368E (нумерация по Кабату), и в котором указанный второй домен СНЗ содержит замены аминокислот L351K и T366K, указанный способ дополнительно включает этап культивирования указанной клетки, обеспечения возможности экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Антитела,

15 которые можно получить с помощью данных способов, также входят в объем настоящего изобретения. Указанные домены гетеродимеризации СНЗ предпочтительно представляют собой домены гетеродимеризации IgG1. Константные области тяжелых цепей, содержащие домены гетеродимеризации СНЗ, предпочтительно представляют собой константные области IgG1.

20 В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению. Указанная молекула нуклеиновой кислоты (обычно, *in vitro*, выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота) предпочтительно кодирует переменную область тяжелой

25 цепи, изображенную на фигуре 16А, или фигуре 16В, или фигуре 37, или переменную область тяжелой цепи, изображенную на фигуре 16А, или фигуре 16В, или фигуре 37, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинацию. В предпочтительном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты включает последовательность, изображенную на

30 фигуре 16 или фигуре 37. В другом предпочтительном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты кодирует ту же последовательность аминокислот, что и нуклеиновая кислота, изображенная на фигуре 16 или фигуре 37, но имеет

отличную последовательность, так как она кодирует один или более отличных кодонов. Например, такую молекулу нуклеиновой кислоты кодон-оптимизируют для клеток-продуцентов антител, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NS0 или клетки PER-C6<sup>TM</sup>. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь, представленную на фигуре 16D или фигуре 37.

Молекула нуклеиновой кислоты, используемая в настоящем изобретении, обычно, но не исключительно, представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК) или дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Альтернативные нуклеиновые кислоты доступны квалифицированному специалисту в данной области. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, например, содержится в клетке. Когда указанная нуклеиновая кислота экспрессируется в указанной клетке, указанная клетка продуцирует антитело согласно настоящему изобретению. Следовательно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена клетка, содержащая антитело согласно настоящему изобретению и/или нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно клетку человека. Для целей настоящего изобретения подходящая клетка представляет собой любую клетку, способную содержать и предпочтительно продуцировать антитело согласно настоящему изобретению и/или нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложена клетка, содержащая антитело согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанная клетка (обычно, *in vitro*, выделенная или рекомбинантная клетка) продуцирует указанное антитело. В предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку CHO, клетку NS0 или клетку PER-C6<sup>TM</sup>. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO. Дополнительно предложена культура клеток, содержащая клетку согласно

настоящему изобретению. Различные организации и компании разработали линии клеток для крупномасштабного производства антитела, например, для применения в клинике. Лишь некоторыми из примеров таких линий клеток являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.C6™. Данные клетки также применяют для  
5 других целей, таких как получение белков. Линии клеток, разработанные для промышленного производства белков и антител, в данной заявке далее называют промышленными линиями клеток. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено применение линии клеток, разработанной для крупномасштабного производства антитела, для  
10 получения антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки согласно настоящему изобретению и сбор указанного антитела из указанной культуры. Предпочтительно указанную клетку культивируют в бессывороточной среде. Предпочтительно  
15 указанная клетка пригодна для выращивания в суспензии. Дополнительно предложено антитело, которое можно получить с помощью способа получения антитела согласно настоящему изобретению. Антитело предпочтительно очищают из культуральной среды. Предпочтительно указанное антитело очищают аффинным способом.

20 Клетка согласно настоящему изобретению, например, представляет собой линию клеток гибридомы, клетку CHO, клетку NS0 или другой тип клеток, известный своей пригодностью для продукции антител для клинических целей. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку человека. Предпочтительно клетку, которая трансформирована областью E1 аденовируса или ее функциональным эквивалентом.  
25 Предпочтительным примером такой линии клеток является линия клеток PER.C6™ или ее эквивалент. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительно вариант, в котором используют векторную систему на основе глутаминсинтетазы (GS) для  
30 экспрессии антитела.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно настоящему изобретению. Указанная фармацевтическая композиция предпочтительно содержит (фармацевтически приемлемое) вспомогательное вещество или носитель. В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит 5 - 50 мМ гистидин, 100 - 300 мМ трегалозу, 0,1 - 0,3 г/л полисорбата 20, или их комбинацию. рН предпочтительно устанавливают на уровне рН = 5,5 – 6,5. В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит 25 мМ гистидин, 220 мМ трегалозу, 0,2 г/л полисорбата 20, или их комбинацию. рН предпочтительно устанавливают на уровне рН = 5,5 – 6,5, наиболее предпочтительно на уровне рН = 6.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно дополнительно содержит метку, предпочтительно метку для визуализации *in vivo*. Такая метка обычно необязательна для применения в терапии. Например, метка может быть полезна для применения в диагностике. Например, для визуализации клеток-мишеней в организме. Пригодны различные метки, и многие из них хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте реализации метка представляет собой радиоактивную метку для детектирования. В другом предпочтительном варианте реализации метка представляет собой инфракрасную метку. Предпочтительно инфракрасная метка подходит для визуализации *in vivo*. Различные инфракрасные метки доступны квалифицированному специалисту в данной области. Предпочтительные инфракрасные метки представляют собой, например: IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye 700DX; IRDye 800RS IRDye 650; IRDye 700 фосфорамидит; IRDye 800 фосфорамидит (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Линкольн, Небраска).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть риск развития указанной опухоли, включающий введение указанному субъекту антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Указанный способ

предпочтительно включает, перед началом указанного лечения, определение того, присутствует ли у указанного субъекта такая положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть ли риск ее развития. В некоторых вариантах реализации субъекта классифицируют как [+] или [++] по ErbB-2. В другом варианте реализации субъекта классифицируют как [+++] по ErbB-2. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития. Другими словами, в соответствии с настоящим изобретением предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для производства лекарственного средства или профилактического агента для лечения положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли. В данной заявке в объеме термина лечение входит профилактика.

Опухоль предпочтительно представляет собой положительный по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 рак. Предпочтительно указанный положительный рак представляет собой рак молочной железы, такой как рак молочной железы на ранней стадии. Тем не менее, настоящее изобретение можно применять при широком диапазоне положительных по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 раков, таких как рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточная саркома, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи, меланома и тому подобные раки. Указанное антитело согласно настоящему изобретению обычно способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3, предпочтительно вызванный лигандом рост, на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по

ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Следовательно, дополнительно предложено антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, предпочтительно рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточная саркома, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланома, при этом аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ. В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело представляет собой антитело PB4188.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит сайт связывания

антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.

5           Следовательно, дополнительно предложено антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, предпочтительно рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточная саркома, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланома, при этом  
10           указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172,  
15           G179, S180 или R181,  
20           и/или при этом указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.  
25

          Субъект предпочтительно представляет собой человека. Субъект предпочтительно представляет собой субъекта, подходящего для терапии моноклональным антителом с применением специфического к ErbB-2 антитела, такого как трастузумаб. В предпочтительном варианте реализации у субъекта есть  
30           опухоль, предпочтительно положительный по ErbB-2/ErbB-3 рак, предпочтительно опухоль/рак с устойчивым к направленной против ErbB-2 терапии фенотипом и/или фенотипом херегулиновой резистентности, предпочтительно с устойчивым к

моноклональному антителу фенотипом. Опухоль с таким фенотипом может ускользнуть от лечения с применением современной направленной против HER2 схемы, такой как (но не ограничиваясь ею) терапия моноклональным антителом против ErbB-2.

5

Количество антитела согласно настоящему изобретению, которое нужно ввести пациенту, обычно находится в рамках терапевтического окна; это означает, что применяют количество, достаточное для оказания терапевтического действия, при этом данное количество не превышает порогового значения, приводящего к неприемлемому уровню побочных действий. Обычно чем ниже количество антитела, необходимое для оказания желательного терапевтического действия, тем шире будет терапевтическое окно. Антитело согласно настоящему изобретению, оказывающее достаточное терапевтическое действие при низкой дозировке, следовательно, будет предпочтительным. Указанная дозировка может находиться в диапазоне схемы применения трастузумаба или быть ниже.

10  
15

В настоящем изобретении описаны, среди прочего, антитела, которые нацелены на рецепторы ErbB-2 и ErbB-3 и приводят к эффективному ингибированию пролиферации линий раковых клеток *in vitro* и ингибированию роста опухоли *in vivo*, даже в присутствии механизма ускользания, такого как, например, повышенная экспрессия NRG1- $\beta$ 1. Идентифицировали разнообразный набор связывающих плеч Fab человека и мыши, специфических либо к ErbB-2, либо к ErbB-3. Их получали в виде биспецифических антител путем клонирования в комплементарные векторы экспрессии, которые содержали мутации в области СНЗ, приводящие к гетеродимеризации тяжелых цепей. Более 500 биспецифических антител получили в малом масштабе и исследовали в анализе связывания и функциональном анализе на трех различных линиях раковых клеток. Различные биспецифические антитела выбирали и исследовали в модели ортотопического ксенотрансплантата, применяя линию клеток VxPC3. Данная линия клеток экспрессирует рецепторы к обоим ErbB-2 и ErbB-3, и ее рост частично зависит от лиганда ErbB-3. Модели VxPC3 представляют собой надежные и точные модели скрининга. Более того, подтвердили сильную противоопухолевую

20

25

30

активность *in vivo*, применяя модель ксенотрансплантата, используя линию клеток JMT-1. Клетки JMT-1 были получены из метастаза в плевру из пациента в возрасте 62 лет с раком молочной железы, у которого наблюдалась клиническая устойчивость к трастузумабу. Клетки JMT-1 растут в виде прикрепленного к субстрату монослоя и образуют ксенотрансплантаты опухолей у голых мышей. Клетки JMT-1 содержат амплифицированный онкоген HER-2, в кодирующей последовательности которого не выявили идентифицируемых мутаций. Клетки JMT-1 сверхэкспрессируют мРНК и белок HER-2, а уровни мРНК и белка HER-1, HER-3 и HER-4 близки к таковым в чувствительной к трастузумабу линии клеток SKBR-3 (Tanner и др., Mol Cancer Ther 2004).

Важно отметить, что применяя антитело согласно настоящему изобретению, добились лучшего противоопухолевого действия по сравнению с применяемыми в настоящее время моноклональными антителами трастузумабом и пертузумабом, а также химическим соединением лапатинибом.

Антитела согласно настоящему изобретению можно получить на уровнях > 50 мг/л после временной трансфекции суспензионных клеток 293F. Биспецифические антитела можно очистить до более чем 98% чистоты с выходом > 70%. В исследованиях аналитических характеристик выявили профили биспецифического антитела IgG1, которые сопоставимы с таковыми для бивалентного моноспецифического IgG1. В отношении функциональной активности, биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению может демонстрировать лучшую эффективность по сравнению с комбинацией трастузумаб + пертузумаб *in vitro* и *in vivo*.

В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения предложена комбинированная терапия. В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению комбинируют с нацеленным на ErbB-2 агентом, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий ErbB-2.

Примеры нацеленных на ErbB-2 агентов для применения в комбинированной терапии со связывающим ErbB-2, ErbB-3 биспецифическим антителом, включают любой нацеленный на ErbB-2 агент, например, связывающий ErbB-2 агент или ингибитор ErbB-2.

Нацеленный на ErbB-2 агент может представлять собой низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы HER2, такой как лапатиниб (тайверб/тайкерб®), нератиниб, афатиниб, тукатиниб или AZD8931.

- Нацеленный на ErbB-2 агент может представлять собой антитело.
- 5 Трастузумаб или пертузумаб, например, могут быть предпочтительны, поскольку данные антитела связывают различные эпитопы ErbB-2, так что они не конкурируют за один и тот же эпитоп с антителом согласно настоящему изобретению, как показано в Примерах.

- Нацеленный на ErbB-2 агент может представлять собой конъюгат антитела с лекарственным средством, например, трастузумаб эмтанзин или DS-8201.
- 10

В другом варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению комбинируют с MM-121 (№Ab6) или RG7116 (Roche), поскольку данные антитела связывают отличные эпитопы ErbB-3, так что они не конкурируют за один и тот же эпитоп с антителом согласно настоящему изобретению, как показано в Примерах.

- 15 В другом предпочтительном варианте реализации связывающее соединение, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, комбинируют с ингибитором компонента сигнального пути PI3-киназы и/или с ингибитором компонента сигнального пути MAPK, таким как, например, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор PI3Ka, ингибитор Akt, ингибитор mTOR или ингибитор Src. В одном
- 20 варианте реализации связывающее соединение, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, комбинируют с разрушающим микротрубочки лекарственным средством или с ингибитором деацетилазы гистонов (HDAC). Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили синергичное действие при применении данных комбинаций. Следовательно, дополнительно предложен способ лечения
- 25 субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть риск развития указанной опухоли, указанный способ включает введение указанному субъекту:

- связывающего соединения, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, и
  - одного или нескольких соединений, выбранных из группы, состоящей из
- 30 ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора деацетилазы гистонов (HDAC). Указанный ингибитор

предпочтительно включает ингибитор тирозинкиназы, ингибитор PI3Ka, ингибитор Akt, ингибитор mTOR или ингибитор Src. Указанный ингибитор тирозинкиназы предпочтительно представляет собой афатиниб, лапатиниб и/или нератиниб. Указанный ингибитор PI3Ka предпочтительно представляет собой

5 BYL719. В одном варианте реализации указанный ингибитор Akt представляет собой МК-2206. В одном предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. В одном предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор Src представляет собой саракатиниб. В

10 одном предпочтительном варианте реализации указанное разрушающее микротрубочки лекарственное средство представляет собой паклитаксел. В одном предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор HDAC представляет собой вориностат. В одном предпочтительном варианте реализации указанное связывающее соединение, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, представляет собой MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals). В одном предпочтительном варианте

15 реализации указанное связывающее соединение, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, представляет собой биспецифическое антитело. В одном предпочтительном варианте реализации указанное связывающее соединение, которое специфично к ErbB-2 и ErbB-3, представляет собой биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению.

20 Следовательно, дополнительно предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть риск развития указанной опухоли, указанный способ включает введение указанному субъекту:

- биспецифического антитела, содержащего первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает

25 ErbB-3, и

- одного или нескольких соединений, выбранных из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства

30 и ингибитора HDAC.

Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания

антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли, при этом указанное лечение включает введение указанного биспецифического антитела и по меньшей мере одного соединения, выбранного из группы, состоящей из ингибитора компонента

5 сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, субъекту, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль. Предпочтительно биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый сайт связывания антигена, который

10 связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3, комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC. Указанный

15 ингибитор предпочтительно включает ингибитор тирозинкиназы, ингибитор PI3Ka, ингибитор Akt, ингибитор mTOR или ингибитор Src. Указанный ингибитор тирозинкиназы предпочтительно представляет собой афатиниб, лапатиниб и/или нератиниб. Указанный ингибитор PI3Ka предпочтительно представляет собой

20 BYL719. В одном варианте реализации указанный ингибитор Akt представляет собой МК-2206. В одном предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. В одном предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор Src представляет собой саракатиниб. В одном предпочтительном варианте реализации указанное разрушающее микротрубочки лекарственное средство представляет собой паклитаксел. В одном

25 предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор HDAC представляет собой вориностат.

Указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак

30 пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточную саркому, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной

железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланому. В наиболее предпочтительном случае указанная опухоль представляет собой рак молочной железы. В одном варианте реализации указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль содержит менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на поверхности клетки на опухолевую клетку.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, которое комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, МК-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела, как правило, способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3, предпочтительно вызванный лигандом рост, на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

В одном предпочтительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, которое комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, MK-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела, содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

В одном предпочтительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, которое комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, MK-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела, содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.

Предпочтительно биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, содержащее по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, и/или содержащее по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37, комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, МК-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела.

В одном предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, содержащее: - специфичную к ErbB-2 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи: MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или содержащее специфичную к ErbB-2 последовательность вариабельной области тяжелой цепи,

которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам от последовательностей переменных областей тяжелой цепи MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898, и

- специфичную к ErbB-3 последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей переменной области тяжелой цепи: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенной на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или содержащее специфичную к ErbB-3 последовательность переменной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам от последовательностей переменных областей тяжелой цепи MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074,

комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, МК-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела. В одном предпочтительном варианте реализации антитело PB4188 комбинируют с одним или несколькими соединениями, выбранными из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора

компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, более предпочтительно с по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из афатиниба, лапатиниба, нератиниба, BYL719, МК-2206, эверолимуса, саракатиниба, вориностата и паклитаксела.

10 В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения предложены применения антитела согласно настоящему изобретению в условиях стресса, вызванного херегулином. Херегулин представляет собой фактор роста, который участвует в росте положительных по ErbB-3 опухолевых клеток. Обычно, если опухолевые клетки экспрессируют высокие уровни херегулина (называют  
15 вызванным херегулином стрессом), то известные на сегодняшний день методы лечения, такие как трастузумаб, пертузумаб и лапатиниб, оказываются неспособны ингибировать рост опухоли. Данный феномен называют херегулиновой резистентностью. Неожиданно, тем не менее, антитело согласно настоящему изобретению также способно противодействовать росту опухолевых клеток,  
20 которые экспрессируют высокие уровни херегулина. В данной заявке уровень экспрессии херегулина считают высоким, если в клетке уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от  
25 уровня экспрессии херегулина в клетках VXPC3 или MCF7. Уровни экспрессии херегулина, например, измеряют, применяя количественную ПЦР с РНК опухоли (такую как, например, описанная в Shames и др. PLOS ONE, февраль, 2013 г., том 8, выпуск 2, стр. 1 – 10, и в Yonesaka и др., Sci.transl.Med., том 3, выпуск 99 (2011); стр. 1 -11), или применяя способы обнаружения белка, такие как, например,  
30 твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), предпочтительно используя образцы крови, плазмы или сыворотки (такие как, например, описанные в Yonesaka и др., Sci.transl.Med., том 3, выпуск 99 (2011); стр. 1 - 11). Следовательно,

дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, при этом в указанных клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2. Также предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7, указанный способ включает введение указанному субъекту антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. В одном предпочтительном варианте реализации предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7. Указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточную саркому, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланому. В

наиболее предпочтительном случае указанная опухоль представляет собой рак молочной железы. Следовательно, дополнительно предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует или у которого есть риск развития рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака толстого кишечника, рака желудка и пищевода, рака пищевода, рака эндометрия, рака яичников, рака печени, рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточной саркомы, рака слюнных желез, рака головы и шеи, рака головного мозга, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи или меланомы, предпочтительно рака молочной железы, при этом в клетках указанного рака уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или MCF7. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2.

Высокие уровни херегулина обычно присутствуют в процессе образования метастазов (т.е. миграции, инвазии, роста и/или дифференцировки опухолевых клеток или иницирующих опухоль клеток). Обычно иницирующие опухоль клетки идентифицируют на основании маркеров стволовых клеток, таких как, например, CD44, CD24, CD133 и/или ALDH1. Следовательно, данным процессам едва ли можно противодействовать с помощью известных на сегодняшний день методов лечения, таких как трастузумаб и пертузумаб. Поскольку антитело согласно настоящему изобретению способно противодействовать росту и/или дифференцировке опухолевых клеток или иницирующих опухоль клеток, которые экспрессируют высокие уровни херегулина, такое антитело согласно настоящему изобретению также является особенно подходящим для противодействия образованию метастазов. Следовательно, дополнительно предложен способ противодействия образованию метастазов у субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, в котором в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке

опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или

5 MCF7, включающий введение указанному субъекту биспецифического антитела, содержащего первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3. Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает

10 ErbB-3, для применения для лечения или предотвращения образования метастазов, при этом в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по

15 меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или MCF7. Дополнительно предложено применение биспецифического антитела согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения образования метастазов, при этом в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке опухоли уровень

20 экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или MCF7. Указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль

25 предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточную саркому, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной

30 железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланому. В наиболее предпочтительном случае указанная опухоль представляет собой рак молочной железы. Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое

антитело согласно настоящему изобретению, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения или предотвращения образования метастазов из клеток рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака толстого кишечника, рака желудка и пищевода, рака пищевода, рака эндометрия, рака яичников, рака печени, рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточной саркомы, рака слюнных желез, рака головы и шеи, рака головного мозга, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи или меланомы, предпочтительно из клеток рака молочной железы, при этом в указанных клетках уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или MCF7. Указанное антитело согласно настоящему изобретению обычно способно снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3, предпочтительно вызванный лигандом рост, на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Аффинность указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит сайт связывания антигена, который

связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.

В одном предпочтительном варианте реализации предложен способ согласно настоящему изобретению для лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках VXPC3 или MCF7, или предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения в таком лечении, при этом указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16A или на фигуре 16E.

В одном предпочтительном варианте реализации предложен способ согласно настоящему изобретению для лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере

60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7, или предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения в таком лечении, при этом указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. В одном варианте реализации предложено антитело PB4188 для применения для лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7.

Как уже описано, антитела согласно настоящему изобретению особенно подходят для лечения положительных по ErbB-2 опухолевых клеток с менее чем 1000000 рецепторов ErbB-2 на их поверхности. Пациенты с такими опухолями, которых обычно классифицируют как ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+], включают пациентов с первичными опухолями, а также пациентов с рецидивировавшими положительными по ErbB-2 опухолями. Используемые в настоящее время методы лечения, такие как трастузумаб (герцептин) и пертузумаб, назначают только пациентам со злокачественными положительными по ErbB-2 клетками, которые содержат более чем 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей поверхности, которых классифицируют как ErbB-2 [+++]. Пациентов, которых классифицируют как ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+], следовательно, предпочтительно лечат антителом согласно

настоящему изобретению. Следовательно, дополнительно предложены способ или антитело для применения согласно настоящему изобретению, при этом у указанного субъекта есть положительная по ErbB-2 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, которая содержит менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на поверхности на опухолевую клетку. В одном предпочтительном варианте реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения или предотвращения образования метастазов, при этом в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках VХРС3 или MCF7, и при этом указанная опухолевая клетка содержит менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на поверхности клетки.

В другом предпочтительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению применяют для противодействия положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли у субъекта, который страдает сердечной недостаточностью или у которого есть риск ее развития. Наличие сердечной недостаточности означает, что у субъекта сердечная функция, например, фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ), составляет менее чем 90%, предпочтительно менее чем 85% или менее чем 80%, предпочтительно менее чем 75% или менее чем 70% от здоровой сердечной функции. Указанная здоровая сердечная функция представляет собой, например, среднюю сердечную функцию (такую как, например, средняя ФВЛЖ) здоровой популяции. В качестве альтернативы, указанная здоровая сердечная функция представляет собой функцию (такую как ФВЛЖ), измеренную у пациента перед началом противоопухолевой терапии антителом согласно настоящему изобретению.

Сердечную функцию, например, отслеживали путем физикального осмотра субъекта и путем исследования ФВЛЖ, применяя например, эхокардиографию или многопроеекционное радиоизотопное исследование сердца (сканирование MUGA).

ErbB-2 участвует в росте, репарации и выживаемости кардиомиоцитов у взрослых как часть сигнальной сети, которая включает комплекс рецепторов херегулина HER2:HER4. Ранее в данной заявке описано, что кардиотоксичность является известным фактором риска при нацеленных на ErbB-2 методах лечения, и частота осложнений повышается, когда трастузумаб применяют в сочетании с антрациклинами, тем самым вызывая сердечный стресс. Например, комбинация доксициклина с трастузумабом оказывает тяжелые побочные действия на сердце. Несмотря на возрастающее количество клинических случаев вызванной трастузумабом дисфункции сердца, механизм его действия неизвестен. Принимая во внимание кардиотоксичность известных на сегодняшний день методов лечения, направленных против положительных по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухолей, особенно предпочтительно применять антитело согласно настоящему изобретению. В примерах показано, что в настоящем изобретении предложены антитела, которые не влияют или в значительно меньшей степени по сравнению с трастузумабом и пертузумабом влияют на выживаемость кардиомиоцитов. Это дает существенное преимущество, поскольку кардиотоксичность уменьшается. Это уже является преимуществом для людей, которые не страдают от сердечной недостаточности, и является еще большим преимуществом для людей, которые уже страдают от сердечной недостаточности, таких как, например, субъекты, страдающие от застойной сердечной недостаточности (ЗСН), дисфункции левого желудочка (ДЛЖ) и/или сниженной фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), и/или субъекты, у которых был инфаркт миокарда. Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее чем 90%, предпочтительно менее чем 85%, или менее чем 80%, или менее чем 75%, или менее чем 70% от здоровой сердечной функции. Указанная сердечная функция предпочтительно включает ФВЛЖ. Указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого,

включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточную саркому, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланому. В наиболее предпочтительном случае указанная опухоль представляет собой рак молочной железы. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. В одном предпочтительном варианте реализации предложен способ согласно настоящему изобретению для лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее чем 90%, предпочтительно менее чем 85%, предпочтительно менее чем 80%, предпочтительно менее чем 75% или менее чем 70% от здоровой сердечной функции, или антитело согласно настоящему изобретению для применения в таком лечении, при этом указанное антитело содержит:

- по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от перечисленных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи; и/или
- по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068;

MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами, более  
5 предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от перечисленных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи. В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело представляет собой PB4188.

10 В одном варианте реализации указанное биспецифическое антитело предназначено для применения для лечения субъекта в условиях стресса, вызванного херегулином, что объяснено более подробно в других местах в данной заявке. Следовательно, дополнительно предложено биспецифическое антитело  
15 согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее чем 90%, предпочтительно менее чем 85%,  
20 предпочтительно менее чем 80%, предпочтительно менее чем 75% или менее чем 70% от здоровой сердечной функции, и при этом в указанных клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%,  
25 предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или MCF7. Указанная сердечная функция предпочтительно включает ФВЛЖ. Также  
30 предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее чем 90%, предпочтительно менее чем 85%,  
предпочтительно менее чем 80%, предпочтительно менее чем 75%, предпочтительно менее чем 70% от здоровой сердечной функции, и при этом в  
клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по  
меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более

предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7, указанный способ включает введение указанному субъекту биспецифического антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. В одном предпочтительном варианте реализации

5 предложено применение биспецифического антитела согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли у субъекта, сердечная функция которого, предпочтительно ФВЛЖ, составляет менее чем 90%, предпочтительно менее 85%, предпочтительно менее 80%, предпочтительно менее 75% или менее

10 70% от здоровой сердечной функции, предпочтительно от здоровой ФВЛЖ, при этом в клетках указанной опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии

15 херегулина в клетках ВХРС3 или МСF7.

Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения или

20 предотвращения образования метастазов, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее 90%, предпочтительно менее 85%, предпочтительно менее 80%, предпочтительно менее 75%, предпочтительно менее 70% от здоровой сердечной функции. Дополнительно предложено применение биспецифического антитела согласно настоящему изобретению для получения

25 лекарственного средства для лечения или предотвращения образования метастазов, при этом у указанного субъекта сердечная функция составляет менее 90%, предпочтительно менее 85%, предпочтительно менее 80%, предпочтительно менее 75%, предпочтительно менее 70% от здоровой сердечной функции. Указанная положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль предпочтительно

30 представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак желудка и пищевода, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак печени, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого,

светлоклеточную саркому, рак слюнных желез, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кожи или меланому. В наиболее предпочтительном случае указанная опухоль представляет собой рак молочной железы. Указанная сердечная функция предпочтительно включает ФВЛЖ. В одном предпочтительном варианте реализации указанное антитело представляет собой антитело РВ4188.

В другом варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению применяют для противодействия фосфорилированию различных факторов способствующего выживаемости клеток пути Akt (также называемого PI3-киназным путем) и MAP-киназного пути. Они представляют собой способствующие пролиферации пути передачи сигналов от HER3. Неожиданно, авторы настоящего изобретения добились успеха в значительном ингибировании фосфорилирования Akt, ERK1/2 и рибосомного белка S6 (S6-RP) антителом согласно настоящему изобретению, тогда как трастузумаб и пертузумаб не оказывают такого сильного действия против фосфорилирования. Противодействие фосфорилированию факторов способствующих пролиферации сигнальных путей PI3-киназы и MAP-киназы является преимуществом, поскольку это препятствует росту положительной по ErbB-3 клетки опухоли. Следовательно, дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для противодействия, предпочтительно ингибирования фосфорилирования Akt, ERK1/2 и/или S6-RP. Важно отметить, что фосфорилирование Akt можно значительно уменьшить или даже полностью заблокировать антителом согласно настоящему изобретению, как *in vitro*, так и *in vivo*, как показано в Примерах. Следовательно, в предпочтительном варианте реализации предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для противодействия, предпочтительно ингибирования фосфорилирования Akt. Также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для противодействия образованию комплекса HER3-p85. Поскольку образование комплекса HER3-p85 является первой фазой при активации Akt, то противодействие образованию указанного комплекса HER3-p85 является предпочтительным. Указанное антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой

биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает домен I ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает домен III ErbB-3. Указанное антитело предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181. В качестве дополнения или альтернативы, указанное антитело предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из F409 и R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3. В одном варианте реализации указанное антитело содержит по меньшей мере одну последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 или по меньшей мере одну последовательность VH, изображенную на фигуре 16 или фигуре 37. В одном варианте реализации указанное антитело представляет собой PB4188.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения индивида, у которого присутствует положительная по ErbB-2 опухоль или есть риск развития положительной по ErbB-2 опухоли, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду нацеленного на ErbB-2 агента, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий ErbB-2, такой как бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

Если ингибитор ErbB-2 представляет собой моноспецифическое антитело, то указанное моноспецифическое антитело и биспецифическое антитело предпочтительно связывают различные эпитопы на ErbB-2. Различные эпитопы ErbB-2 предпочтительно находятся на различных внеклеточных доменах ErbB-2.

Моноспецифическое антитело может предпочтительно связывать эпитоп на внеклеточном домене IV, домене II или домене III ErbB-2. Биспецифическое антитело может предпочтительно связывать эпитоп на внеклеточном домене I ErbB-2.

- 5           Нацеленный на ErbB-2 агент может содержать конъюгированное лекарственное средство, в частности, когда ингибитор ErbB-2 представляет собой моноспецифическое антитело, указанное моноспецифическое антитело предпочтительно содержит конъюгированное лекарственное средство, например, адо-трастузумаб эмтанзин (кадсила®).
- 10           Конъюгированное лекарственное средство также может находиться на биспецифическом антителе или как на биспецифическом антителе, так и на нацеленном на ErbB-2 агенте. Конъюгат с лекарственным средством предпочтительно включает эмтанзин. Конъюгаты антител с лекарственным средством, или АЛК, представляют собой важный класс высокоэффективных
- 15 биофармацевтических средств, разработанных в качестве таргетной терапии для лечения людей, страдающих раком. В отличие от химиотерапии, АЛК предназначены для нацеливания и уничтожения только раковых клеток и сбережения здоровых клеток. Конъюгат с лекарственным средством представляет собой антитело, связанное с биологически активной цитотоксической
- 20 (противораковой) нагрузкой или лекарственным средством. Объединяя в себе уникальные способности моноклональных антител и способность уничтожать рак цитотоксических лекарственных средств, конъюгаты антител с лекарственным средством позволяют точно различать здоровые и больные ткани. Это означает, что, в противоположность обычным химиотерапевтическим агентам, конъюгаты
- 25 антител с лекарственным средством нацеливаются на раковую клетку и атакуют ее так, что здоровые клетки не так сильно поражаются. Конъюгаты антитела с лекарственным средством описаны в DiJoseph и др.; Blood. 2004 103(5):1807-14. Mullard A. Nature Reviews Drug Discovery 12, 329–332 (2013); Zolot RS и др.; Nature Reviews Drug Discovery 12, 259-260 (2013); Merten и др.; Bioconjug Chem 2015;
- 30 26:2176-2185; Schlom и др.; Cancer Res. 1992; 52(5):1067-72. Rohrer T. Journal of Antibody-drug Conjugates. 21 июня 2013 г. Подходящие лекарственные средства для включения в АЛК представляют собой ауристатины (ингибиторы полимеразы

тубулина); майтансины (деполимеризация тубулина); калихеамицины (расщепление ДНК); дуокармицины (алкилирующие агенты, которые связываются с малой бороздкой ДНК); димеры пирролбензодиазепина (ПБД-димеры, кросслинкеры малой бороздки ДНК) и  $\alpha$ -аманитин (ингибитор РНК-полимеразы  
5 II). В предпочтительном варианте реализации лекарственное средство представляет собой эмтанзин.

Если ингибитор ErbB-2 представляет собой моноспецифическое антитело, то указанное моноспецифическое антитело предпочтительно представляет собой трастузумаб (номер CAS 180288-69-1). Его можно заменить или комбинировать с  
10 пертузумабом (номер CAS 380610-27-5) В особенно предпочтительном варианте реализации моноспецифическое антитело представляет собой трастузумаб-эмтанзин (T-DM1 также реализуются на рынке под наименованием кадсила®).

Биспецифическое антитело предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания  
15 антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958, или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из MF3958, и при этом указанный  
20 второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178 или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из MF3178. Биспецифическое антитело предпочтительно содержит первый сайт связывания антигена, который  
25 связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3958 и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из MF3178.

30 В предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый

сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

В предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело содержит первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3958, и при этом указанный второй сайт связывания антигена содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178.

В предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело содержит переменный домен, который связывает ErbB-2, и переменный домен, который связывает ErbB-3,

при этом цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-2, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3958, изображенную на фигуре 16А; или

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3958, изображенную на фигуре 16А, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно указанной VH; и

при этом цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, включает

- последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16В; или - последовательность аминокислот цепи VH - MF3178, изображенную на фигуре 16В, содержащую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот, или их комбинацию, относительно последовательности цепи VH, изображенной на фигуре 16B.

Биспецифическое антитело предпочтительно представляет собой антитело  
5 RB4188. Указанное лечение можно комбинировать с химиотерапевтическим лекарственным средством. Таким образом, лечение предпочтительно дополнительно включает введение химиотерапевтического лекарственного средства нуждающемуся в этом индивиду. Для лечения рака было разработано множество различных химиотерапевтических лекарственных средств. Неизменно  
10 некоторые из них более активны чем другие в борьбе с конкретными опухолями.

Химиотерапевтическое лекарственное средство может представлять собой, например, винорелбин, паклитаксел, доцетаксел, гемцитабин, эрибулин, капецитабин или карбоплатин.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена  
15 комбинация нацеленного на ErbB-2 агента, включая ингибитор или связывающий агент, такой как бивалентное моноспецифическое антитело, который содержит сайты связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2; и биспецифического антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной  
20 части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, для применения в способе лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 опухоль или есть риск развития положительной по ErbB-2 опухоли.

Дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая  
25 нацеленный на ErbB-2 агент, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий ErbB-2, такой как бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной  
30 части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3. Также предложен набор из частей, включающий нацеленный на ErbB-2 агент, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий

ErbB-2, такой как бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3. Опухоль предпочтительно представляет собой метастаз опухоли молочной железы. Предпочтительно антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном домене I ErbB-2. Предпочтительно антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном домене III ErbB-3. Способ предпочтительно дополнительно включает введение нацеленного на ErbB-2 агента, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий ErbB-2, такой как моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2. Предпочтительно указанный способ дополнительно включает введение нацеленного на ErbB-2 агента, включая ингибитор ErbB-2 или агент, связывающий ErbB-2, такой как моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3. Ингибитор ErbB-2, такой как моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2 или эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, может включать конъюгат с лекарственным средством. Указанное лекарственное средство предпочтительно включает эмтанзин. Моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на

внечелочной части ErbB-2, предпочтительно представляет собой трастузумаб, пертузумаб или их биоаналог с такой же последовательностью аминокислот вариабельного домена. Антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внечелочной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внечелочной части ErbB-3, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. Биспецифическое антитело предпочтительно представляет собой антитело PB4188. Дополнительно предложено антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внечелочной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внечелочной части ErbB-3, для применения для лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге.

15

У индивида есть риск развития опухоли, как указано в данной заявке, если у указанного индивида была опухоль и указанная опухоль хорошо отвечала на лечение, предоставленное указанному индивиду. Например, если индивид вошел в полную ремиссию, так что количество опухолевых клеток у индивида невозможно измерить с помощью обычных методик, таких как очередная визуализация с помощью сканирования методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) или компьютерной томографии (КТ). У такого индивида, к сожалению, гораздо выше риск развития опухоли либо в очаге исходной опухоли (рецидив опухоли), либо в удаленном очаге (метастатическая опухоль), или риск развития опухоли нового происхождения (например, вызванной лечением). Индивид, у которого есть риск, следовательно, предпочтительно представляет собой индивида, у которого была опухоль и который находится в полной ее ремиссии.

30 Предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанное антитело может снижать

вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Антитело предпочтительно может уменьшать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки. Антитело предпочтительно может уменьшать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки, при этом указанная клетка содержит по меньшей мере 100000 рецепторов ErbB-2 на поверхности клетки на клетку. Предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку MCF-7, клетку SKBR-3, клетку NCI-N87, клетку VxPC-3, клетку BT-474 или клетку JIMT-1. Первый сайт связывания антигена может предпочтительно связываться с доменом I или доменом IV ErbB-2. Второй сайт связывания антигена предпочтительно препятствует связыванию лиганда ErbB-3 с ErbB-3. Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом указанный первый сайт связывания антигена связывает домен I ErbB-2 и указанный второй сайт связывания антигена связывает домен III ErbB-3. Дополнительно предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, при этом аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке равна или больше, чем аффинность указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке. Антитело предпочтительно может снижать вызванную лигандом функцию рецептора ErbB-3 на положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетке. Антитело предпочтительно может уменьшать вызванный лигандом рост положительной по ErbB-2 и ErbB-3 клетки. Аффинность (KD) указанного второго сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Аффинность (KD) указанного первого сайта связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ. Аффинность (KD) указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам BT-474 предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,2 нМ, и/или при этом

аффинность указанного биспецифического антитела по отношению к клеткам SK-BR-3 ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 3,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ. Дополнительно предложено антитело, содержащее два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-2, при этом по меньшей мере один из указанных сайтов связывания антигена связывает домен I ErbB-2. Аффинность (KD) по меньшей мере одного из указанных сайтов связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-2 клетке предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ. Также предложено антитело, которое содержит два сайта связывания антигена, которые связываются с ErbB-3, при этом по меньшей мере один из указанных сайтов связывания антигена связывает домен III ErbB-3. Аффинность (KD) по меньшей мере одного из указанных сайтов связывания антигена по отношению к положительной по ErbB-3 клетке предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Указанная положительная по ErbB-3 клетка и/или указанная положительная по ErbB-2 клетка предпочтительно представляет собой клетку BT-474 или клетку SK-BR-3. Антитело предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена I ErbB-2, выбранную из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах приблизительно 5 положений аминокислот от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181. Оно предпочтительно содержит сайт связывания антигена, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426, и выставленные на поверхность аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-2 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере

последовательность CDR3 из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к ErbB-2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16A или на фигуре 16E, или при этом указанное антитело содержит последовательности CDR, которые отличаются не более чем 3 аминокислотами, предпочтительно не более чем 2 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1 аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из специфичной к ErbB-3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16B, или на фигуре 16E, или на фигуре 37, или при этом указанное антитело содержит последовательности CDR, которые отличаются не более чем 3 аминокислотами, предпочтительно не более чем 2 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1 аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074. Указанное антитело предпочтительно содержит специфичную к ErbB-2 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи: MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971,

MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на фигуре 16А или на фигуре 16Е, или при этом указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами от последовательностей

5 вариабельной области тяжелой цепи MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898. Указанное антитело предпочтительно содержит специфичную к ErbB-3 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области

10 тяжелой цепи: MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на фигуре 16В, или на фигуре 16Е, или на фигуре 37, или при этом указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой

15 цепи, которая отличается не более чем 15 аминокислотами от последовательностей вариабельной области тяжелой цепи MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 или MF6074. Указанное антитело предпочтительно проявляет антитело-

20 зависимую опосредованную клетками цитотоксичность (АЗКЦ). Антитело предпочтительно дефукозилировано для того, чтобы увеличить АЗКЦ. Оно предпочтительно представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Антитело предпочтительно содержит две различные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. Указанные

25 совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации СН3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Предпочтительно оба плеча содержат общую легкую цепь. Указанная общая легкая цепь предпочтительно представляет собой легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека,

30 содержащую фрагмент гена IgVK1-39, наиболее предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgVK1-39\*01/IGJK1\*01. Антитело предпочтительно дополнительно содержит метку, предпочтительно метку для

визуализации *in vivo*. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело, указанное в данной заявке. Также предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть риск развития указанной

5 опухоли, включающий введение указанному субъекту антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Также предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, у которого присутствует положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск ее развития. Биспецифическое антитело

10 предпочтительно значительно не влияет на выживаемость кардиомиоцитов. Указанное биспецифическое антитело предназначено для применения у субъекта, сердечная функция которого составляет менее чем 90% от здоровой сердечной функции. Также предложен способ лечения субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или у которого есть

15 риск развития указанной опухоли, включающий введение указанному субъекту:

- биспецифического антитела, содержащего первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, и
- одного или нескольких соединений, выбранных из группы, состоящей из

20 ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC, предпочтительно одного или нескольких соединений, выбранных из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и

25 паклитаксела. Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли, при этом указанное лечение включает введение указанного биспецифического антитела и по меньшей мере

30 одного соединения, выбранного из группы, состоящей из ингибитора компонента сигнального пути PI3-киназы, ингибитора компонента сигнального пути MAPK, разрушающего микротрубочки лекарственного средства и ингибитора HDAC,

предпочтительно введение указанного биспецифического антитела и по меньшей мере одного соединения, выбранного из группы, состоящей из ингибитора тирозинкиназы, ингибитора PI3Ka, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора Src, вориностата и паклитаксела, субъекту, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль. Указанный ингибитор тирозинкиназы предпочтительно включает афатиниб, лапатиниб и/или нератиниб. Указанный ингибитор PI3K предпочтительно представляет собой BYL719. Указанный ингибитор Akt предпочтительно представляет собой МК 2206. Указанный ингибитор mTOR предпочтительно представляет собой эверолимус. Указанный ингибитор Src предпочтительно представляет собой саракатиниб. Указанное нацеленное на микротрубочки лекарственное средство предпочтительно представляет собой паклитаксел. Указанный ингибитор HDAC предпочтительно представляет собой вориностат. Также предложен способ противодействия образованию метастазов у субъекта, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, в котором в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках VXPC3 или MCF7, включающий введение указанному субъекту биспецифического антитела, содержащего первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3. Также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает ErbB-2, и второй сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3, для применения для лечения или предотвращения образования метастаза из положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетки опухоли, в котором в указанной положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 клетке опухоли уровень экспрессии херегулина составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% от уровня экспрессии херегулина в клетках VXPC3 или MCF7. Предложен способ или антитело для

применения согласно любому из пп. 36 - 50, отличающиеся тем, что у указанного субъекта есть положительная по ErbB-2 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль, которая содержит менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на поверхности клетки на клетку. Указанное антитело предпочтительно представляет собой антитело согласно

5 настоящему изобретению. Указанная опухолевая клетка предпочтительно представляет собой клетку рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака толстого кишечника, рака желудка и пищевода, рака пищевода, рака эндометрия, рака яичников, рака печени, рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточной саркомы, рака слюнных желез, рака головы и шеи,

10 рака головного мозга, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи или меланомы. Предпочтительно сердечная функция у указанного субъекта составляет менее чем 90% от здоровой сердечной функции. Указанная сердечная функция предпочтительно включает фракцию выброса левого желудочка (ФВЛЖ). Указанный субъект

15 предпочтительно страдает от застойной сердечной недостаточности (ЗСН), дисфункции левого желудочка (ДЛЖ) и/или сниженной на  $\geq 10\%$  фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), и/или при этом указанный субъект перенес инфаркт миокарда. Также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для противодействия, предпочтительно ингибирования

20 фосфорилирования Akt, ERK и/или рибосомного белка S6.

С целью ясности и краткости описания признаки описаны в данной заявке в рамках одного или различных вариантов реализации, тем не менее, должно быть очевидно, что в объем настоящего изобретения могут входить варианты реализации,

25 содержащие все комбинации из всех или некоторых из описанных признаков.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

Фигура 1. Титрование антигеном мономерным HER2 панели плеч HER2, которые

30 также присутствуют в активных биспецифических антителах к HER2xHER3, в комбинации с одним плечом PG3178. Все моноклональные антитела к HER2

панели HER2xHER3, за исключением PG3025, исследовали в анализе титрования антигеном HER2 методом ELISA.

5 Фигура 2. Функциональная активность биспецифических антител к HER2 x HER3, исследованная на клетках ВхРС3 при стимуляции лигандом или без нее. Пунктирные линии представляют активность трастузумаба, который является эталонным антителом в данном анализе, при стимуляции лигандом или без нее.

10 Фигура 3. Кривые титрования моноклональных антител к HER2 и HER3 (верхнее изображение) и соответствующих биспецифических антител к HER2 x HER3 (нижнее изображение) в анализе на MCF-7.

15 Фигура 4. Влияние лечения антителом на размер опухоли ВхРС3-luc2 в день 31 в ортотопической модели на мышах. Биоллюминесцентная визуализация (БЛВ, BLI) - рост опухоли, измеренный по биоллюминесценции.

Фигура 5. Влияние лечения антителом на размер опухоли ВхРС3-luc2 в день 31 в ортотопической модели на мышах. БЛВ - рост опухоли, измеренный по биоллюминесценции.

20

Фигура 6. Анализ методом сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) биспецифического антитела к HER2xHER3 и соответствующих исходных моноклональных антител на клетках MCF-7 и ВхРС3-luc2, экспрессирующих HER2. MFI - средняя интенсивность флуоресценции.

25

30 Фигура 7. Аналитическое исследование методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ) и катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (КО-ВЭЖХ). PB4188 (верхнее изображение), исходное моноклональное антитело против HER2 (изображение посередине), эталонное моноклональное антитело IgG против респираторно-синцитиального вируса (RSV) (нижнее изображение).

Фигура 8. Ингибирование пролиферации клеток JMT-1 в мягком агаре серией титров антитела.

- 5 Фигура 9. Ингибирование пролиферации клеток BT-474 (верхнее изображение) и SKBR3 (нижнее изображение) в матрикеле серией титров антитела.

Фигура 10a. Вызванная HRG пролиферация и ветвление/инвазия клеток SKBR-3 в матрикеле.

10

Фигура 10b. Ингибирование вызванной HRG пролиферации и ветвления/инвазии клеток SKBR-3 в матрикеле антителом PB4188 в отличие от исходных моноклональных антител.

- 15 Фигура 10c. Ингибирование вызванной HRG пролиферации и ветвления/инвазии клеток SKBR-3 в матрикеле антителом PB4188 в отличие от моноклональных антител против HER3.

- 20 Фигура 10d. Ингибирование вызванной HRG пролиферации и ветвления/инвазии клеток SKBR-3 в матрикеле антителом PB4188 в отличие от комбинации моноклональных антител против HER3 с трастузумабом.

- 25 Фигура 10e. Ингибирование вызванной HRG пролиферации и ветвления/инвазии клеток SKBR-3 в матрикеле антителом PB4188 и комбинацией PB4188 плюс трастузумаб.

Фигура 11. Повышенная ингибиторная активность PB4188 в HER2<sup>+++</sup> клетках N87 в присутствии 100 нг/мл HRG.

- 30 Фигура 12. Активность АЗКЦ антител PB4188 и PB3448 при титровании дозы.

Фигура 13. Повышенная активность АЗКЦ биспецифического антитела по сравнению с моноклональными исходными антителами или их комбинацией.

5 Фигура 14. Активность АЗКЦ дефукозилированного PB4188 по сравнению с трастузумабом в отношении клеток, экспрессирующих HER2 на низких (верхнее изображение) и высоких (нижнее изображение) уровнях.

10 Фигура 15. Активность АЗКЦ дефукозилированного PB4188 на HER2<sup>+++</sup> клетках SKBR-3 в присутствии репортерных клеток, экспрессирующих высокоаффинный или низкоаффинный вариант FcγR.

15 Фигура 16. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот цепей VH, общей легкой цепи и тяжелых цепей антител согласно настоящему изобретению. В тех случаях, когда на данной фигуре указана лидерная последовательность, она не является частью цепи VH или антитела, а обычно отщепляется в ходе процессинга белка в клетке, которая продуцирует указанный белок.

20 Фигура 17. Влияние лечения антителом на размер опухоли в модели ксенотрансплантата JIMT-1 у мышей. Рост опухоли измеряли путем измерения объема опухоли штангенциркулем в различных группах лечения. Сверху - рост опухоли в течение 60 дней; снизу - ингибирование роста опухоли (TGI) по окончании периода лечения (29 дней).

25 Фигура 18. Кривые выживаемости Каплана-Мейера в различных группах лечения в модели ксенотрансплантата JIMT-1 у мышей.

30 Фигура 19. Ингибирование индуцируемого лигандом роста N87. PB4188 позволяет устранить индуцируемую HRG пролиферацию N87 в широком диапазоне HRG, в отличие от исходного антитела против HER3. Показаны результаты для концентрации антитела, равной 40 нг/мл.

Фигура 20. Измерения аффинности в стационарном состоянии клеток меченого  $^{125}\text{I-IgG HER2xHER3}$  (PB4188) в отношении клеток BT-474 (сверху; три независимых теста) и в отношении клеток SK-BR-3 (снизу; три независимых теста). Неспецифическое связывание определяли, применяя 100-кратный избыток немеченого HER2xHER3.

Фигура 21А. Картирование эпитопов HER2. Выявленные остатки, имеющие решающее значение, представлены в виде черных сфер на кристаллической структуре HER2, выявленные остатки, имеющие вторичное значение, представлены в виде серых сфер (идентификационный номер (ИН) в PDB: 1S78).

Фигура 21В.

а) Кристаллическая структура HER2 (№ в PDB: 1S78), на которой подтвержденные остатки эпитопа PG3958 показаны в виде светло-серых сфер и окружающие остатки (+/- пять аминокислотных остатков) показаны в виде темно-серых сфер. б) Выставленная в растворитель поверхность области эпитопа, на которой подтвержденные остатки эпитопа показаны серым цветом, а окружающие остатки (+/- пять остатков) - черным цветом. в) Подробное изображение области эпитопа, на которой подтвержденные остатки эпитопа показаны светло-серым цветом, а окружающие остатки (+/- пять остатков) - темно-серым цветом. г) Первичная последовательность аминокислот области эпитопа HER2 для PG3958, на которой показаны подтвержденные остатки эпитопа (серый цвет, подчеркнуты), окружающие остатки (черный) и отдаленные остатки (серый цвет, курсив, не показаны на а, б и в). Фигуры и анализ сделаны с использованием Yasara ([www.yasara.org](http://www.yasara.org)).

Фигура 21С.

а) Кристаллическая структура HER3 (№ в PDB: 4P59), на которой показан остаток эпитопа Arg 426 в виде серых сфер, а все выставленные на поверхность остатки внутри радиуса 11,2 Å от Arg 426 - в виде черных сфер. б) Выставленная в растворитель поверхность области эпитопа с Arg 426 и отдаленными остатками

показана серым цветом, а все выставленные на поверхность остатки внутри радиуса 11,2 Å от Arg 426 показаны черным цветом. с) Остатки в области эпитопа с Arg 426 показаны светло-серым цветом, а окружающие остатки (все подписаны) показаны темно-серым цветом. Фигуры и анализ сделаны с использованием Yasara (www.yasara.org).

Фигура 22. Подтверждение остатков, имеющих решающее значение для связывания плеча Fab 3958 с HER2. Трастузумаб включили в анализ в качестве контрольного антитела. Связывание определяли методом FACS с титрованием и выражали связывание в виде площади под кривой (AUC) по сравнению со связыванием трастузумаба. D143Y не считают частью эпитопа 3958, поскольку связывание трастузумаба с данным мутантом также блокируется.

Фигура 23. Остатки, имеющие решающее значение для связывания PG3178, представлены в кристаллической структуре HER3. Выявленные остатки, имеющие решающее значение для связывания PG3178, представлены в виде черных сфер на кристаллической структуре HER3 (№ В PDB: 4P59).

Фигура 24. Подтверждение того, что R426 является остатком, имеющим решающее значение для связывания PG3175 с HER3. Два антитела против HER3 включили в анализ в качестве контрольных антител. Связывание определяли методом FACS с титрованием и связывание выражали в виде AUC по сравнению со связыванием с HER3 дикого типа (ДТ).

Фигура 25. Отсутствие токсичности PB4188 при сердечном стрессе *in vitro*. Инкубация кардиомиоцитов с PB4188 или моноспецифическими эталонными антителами в присутствии 3 мкМ антрациклина доксорубина. Жизнеспособность кардиомиоцитов определяли путем определения количества АТФ и выражали в относительных световых единицах (RLU). Т - трастузумаб; П - пертузумаб.

30

Фигура 26. Связывание PB4188, по сравнению с трастузумабом и антителом к HER3, с клетками с амплифицированным HER2. Проводили FACS с титрованием

на указанных линиях клеток, экспрессирующих различные уровни HER2. Площадь под кривой срединных значений сигнала фикоэритрина (PE) наносили на график для каждой линии клеток.

- 5 **Фигура 27.** Связывание серийных титров PB4188<sup>FITC</sup> с клетками SKBR-3, предварительно инкубированными с насыщенной концентрацией PB4188, трастузумаба или антитела отрицательного контроля. PB4188<sup>FITC</sup> одинаково эффективно связывается с SKBR-3 в присутствии трастузумаба или контрольного антитела.
- 10 **Фигура 28.** Ингибирование пролиферации клеток в условиях стресса HRG биспецифическими антителами к HER2xHER3, состоящими из одного и того же плеча Fab HER3 и различных плеч HER2, которые направлены против четырех доменов HER2.
- 15 **Фигура 29.** Синергичное влияние комбинации PB4188 с лапатинибом на рост и морфологию клеток SKBR-3. Слева: полученные с использованием микроскопа изображения клеток, обработанных в различных условиях; справа: морфологические изменения, представленные графически в зависимости от условий обработки.
- 20 **Фигуры 30А и В.** Ингибирование опосредованного HRG фосфорилирования клеток N87 и SKBR-3 антителом PB4188 в эксперименте в динамике. Трастузумаб + пертузумаб и отдельно HRG включали в эксперименты в качестве контролей.
- 25 **Фигура 31.** Ингибирование опосредованного HRG фосфорилирования клеток N87 антителом PB4188 в эксперименте в динамике. Трастузумаб + пертузумаб и лапатиниб включали в эксперименты в качестве контролей.
- 30 **Фигура 32.** Изменения уровней Akt и фосфорилирования Akt оценивали через 4 часа после введения двух или четырех еженедельных доз PB4188. Уровни фосфорилирования в лизатах опухолей оценивали с помощью анализа Luminescence. Анализ проводили в двух повторах и анализировали пять опухолей на группу.

Фигура 33. Опосредованное РВ4188 влияние *in vivo* на опосредованную HER2:HER3 передачу сигналов, исследованное путем анализа Vera Tag на материале опухоли JMT-1. Опухоли анализировали через 4 ч после введения доз, опухоли, полученные из животных, которым вводили ФБР, включали в эксперименты в качестве контролей.

Фигура 34. РВ4188 подавляло продвижение по клеточному циклу. Клетки, высеянные в аналитическую среду, инкубировали с титрами антител в присутствии стандартной (1 нг/мл) или высокой (100 нг/мл) концентрации HRG. Через 24 часа (или 48 часов для клеток MCF-7) анализировали распределение клеток по различным фазам клеточного цикла (фазам G0/G1, S или G2/M). Коэффициент пролиферации рассчитывали как отношение между процентом клеток в фазах S и G2/M и процентом клеток в фазе G0/G1. П + Т - пертузумаб + трастузумаб.

15

Фигура 35. Интернализация антител, меченых рН-чувствительным красителем, в раковые клетки с повышенной экспрессией HER2. N87 (A, B) и SKBR-3 (C, D), высеянные в аналитическую среду, дополненную 1 нг/мл HRG, инкубировали в течение 24 часов со 100 нМ меченых рН-чувствительным красителем антител. После сбора клетки окрашивали меченым APC вторичным антителом к IgG человека, чтобы детектировать связанные с поверхностью антитела. Клетки анализировали с помощью FACS по флуоресценции в канале PE (A, C), чтобы определить интернализацию, и в канале APC (B, D), чтобы определить связывание антител с поверхностью.

25

Фигура 36. Активность АЗКЦ трастузумаба по сравнению с комбинацией трастузумаб + пертузумаб по отношению к клеткам, полученным из двух различных доноров.

Фигура 37. Выравнивание последовательностей аминокислот и нуклеотидов вариантов F3178. Участки CDR показаны.

Фигура 38. Кривые титрования моноклональных антител к HER3 в зависимости от HRG анализе с использованием клеток N87. PG6058, PG6061 и PG6065 представляют собой варианты PG3178. PG1337 представляет собой отрицательный контроль, специфичный к столбнячному токсину. Результаты нормировали на фоновую пролиферацию в присутствии лиганда на каждом планшете.

Фигура 39. Профили КО-ВЭЖХ для моноклональных антител к HER3. PG6058, PG6061 и PG6065 представляют собой варианты PG3178. Рассчитанная изоэлектрическая точка (pI) области VH и время удерживания (tR) основного пика приведены для каждого антитела.

Фигура 40. Полученные *in vitro* изоболограммы для комбинации лекарственных средств с RB4188 на линиях клеток с амплифицированным HER2 при стрессовых концентрациях HRG (A) или выращивании в матрикеле (B).

Фигура 41. Кривая роста опухоли для подкожной опухоли (4ый пассаж), использованной для внутричерепной имплантации.

Фигура 42. Система балльной оценки отека головного мозга. Примеры T2-взвешенных изображений МРТ примеров балльной оценки отека головного мозга от 0 до 4. Белые стрелки указывают на очаги опухоли, а желтые стрелки указывают на отек.

Фигура 43. Масса тела и объем опухоли в момент включения мышей в группы A-D. Не наблюдали различия в массе тела или объеме опухоли между группами (однофакторный дисперсионный анализ,  $p = 0,43$  (масса тела) и  $p = 0,92$  (объем опухоли)).

Фигура 44. Объем опухоли после начала терапии для четырех групп лечения. На графике представлено среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (CO),  $N = 8 - 6$ /группу. Для каждой группы объем опухоли наносили на график до тех пор, пока по меньшей мере 6 животных были еще живы.

- 5 Фигура 45. Масса тела после начала терапии для четырех групп лечения, выраженная в граммах (слева) и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в группу (справа). На график нанесено только среднее значение,  $N = 8 - 6/\text{группу}$ . Для каждой группы массу тела наносили на график до тех пор, пока по меньшей мере 6 животных были еще живы.
- 10 Фигура 46. Индивидуальный объем опухоли мышей, которым вводили среду, измеренный с помощью T2-взвешенной МРТ.
- Фигура 47. Индивидуальный объем опухоли мышей, которых лечили T-DM1, измеренный с помощью T2-взвешенной МРТ.
- 15 Фигура 48. Индивидуальный объем опухоли мышей, которых лечили MCLA-128, измеренный с помощью T2-взвешенной МРТ.
- Фигура 49. Индивидуальный объем опухоли мышей, которых лечили T-DM1 + MCLA-128, измеренный с помощью T2-взвешенной МРТ.
- 20 Фигура 50. Примеры T2-взвешенных изображений МРТ одной мыши из группы А (M23). На изображениях показаны фронтальный (сверху) и осевой (снизу) срезы.
- 25 Фигура 51. Примеры T2-взвешенных изображений МРТ одной мыши из группы В (M35). На изображениях показаны фронтальный (сверху) и осевой (снизу) срезы.
- Фигура 52. Примеры T2-взвешенных изображений МРТ одной мыши из группы С (M42). На изображениях показаны фронтальный (сверху) и осевой (снизу) срезы.
- 30 Фигура 53. Примеры T2-взвешенных изображений МРТ одной мыши из группы D (M03). На изображениях показаны фронтальный (сверху) и осевой (снизу) срезы.

Фигура 54. Измерения индивидуальных масс тела мышей, которым вводили среду, выраженные в граммах (слева) и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в группу (справа).

5 Фигура 55. Измерения индивидуальных масс тела мышей, которых лечили T-DM1, выраженные в граммах (слева) и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в группу (справа).

10 Фигура 56. Измерения индивидуальных масс тела мышей, которых лечили MCLA-128, выраженные в граммах (слева) и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в группу (справа).

15 Фигура 57. Измерения индивидуальных масс тела мышей, которых лечили T-DM1 + MCLA-128, выраженные в граммах (слева) и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в группу (справа).

20 Фигура 58. Балльная оценка отека в головном мозге на последнем сканировании МРТ для каждой мыши. Объем опухоли в момент балльной оценки различается между данными группами, и объем опухоли может влиять на уровень отека головного мозга. Средний объем опухоли у животных, которых лечили T-DM1 и T-DM1 + MCLA-128, был меньше по сравнению с животными, которым вводили среду или MCLA-128. По этой причине, результаты следует интерпретировать с осторожностью.

25 Фигура 59. Кривая Каплана-Мейера результатов выживаемости для всех групп. Срединное значение выживаемости составляло 13, 19,5, 29 и 42 дня для животных, которым вводили среду, TDM1, MCLA-128 и T-DM1 + MCLA-128, соответственно. Кривые выживаемости значимо различались ( $p < 0,0001$ , логарифмический ранговый критерий).

30

Фигура 60. Парное сравнение кривых Каплана-Мейера. Значимо большее срединное значение выживаемости наблюдали для мышей, которых лечили T-DM1

(19,5 дней), MCLA-128 (29 дней) и T-DM1 + MCLA-128 (42 дня), по сравнению с мышами, которым вводили среду (13 дней). Не наблюдали различия в среднем значении выживаемости между мышами, которых лечили T-DM1 и MCLA-128. У мышей, которых лечили T-DM1 + MCLA-128, наблюдали значимо большее срединное значение выживаемости по сравнению с мышами, которых лечили T-DM1 или MCLA-128 отдельно.

Фигура 61. Дизайн исследования для клинического испытания комбинированной терапии (двухкомпонентной и трехкомпонентной).

10

Фигура 62. Введение двухкомпонентной терапии в клиническом испытании комбинированной терапии.

Фигура 63. Введение трехкомпонентной терапии в клиническом испытании комбинированной терапии.

15

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

#### 5 Методы, материалы и скрининг антител

##### Линии клеток:

Линии клеток ВхРС-3-luc2 (Perkin Elmer 125058), N87 (ATCC® CRL-5822™), SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™), BT-474 (ATCC® HTB-20™), JIMT-1 (DSMZ ACC 589), L929 (Sigma Aldrich 85011425), K562 (DSMZ ACC10), HEK293T (ATCC® -CRL-11268™), CHO-K1(DSMZ ACC110 ), MCF-7 (DSMZ ACC 115), MDA-MB-468 (#300279-513, Cell line services) SK-OV-3 (ATCC ® HTB-77™), MDA-MB-175 (ATCC-HTB-25), MDA-MB-453 (ATCC-HTB-131), MDA-MB-361(ATCC-HTB-27), ZR-75-1 (ATCC-CRL-1500) и MKN-45 (DSMZ ACC409) приобретали у ATCC, DSMZ или Sigma Aldrich и поддерживали обычным способом в ростовых средах, дополненных 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (ФБС). Клетки HEK293F Freestyle получали от Invitrogen и поддерживали обычным способом в среде 293 FreeStyle.

#### 20 Получение рекомбинантных векторов человека, цыпленка, крысы и векторов с заменой доменов (клонирование HER)

*HER2 человека.* Полноразмерный HER2 человека амплифицировали с помощью ПЦР с кДНК, полученной из РНК, выделенной из линии клеток рака молочной железы JIMT-1. Праймеры, используемые для амплификации HER2 человека, описаны далее. Прямой праймер: AAGCTGGCTAGCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGC, обратный праймер: AATAATTCTAGACTGGCACGTCCAGACCCAGG. Полноразмерный амплифицированный продукт расщепляли с помощью NheI и XbaI и впоследствии клонировали в соответствующие сайты pcDNA3.1 (Invitrogen).

Последовательность проверяли путем сравнения с эталонной последовательностью NCBI NM\_004448.2. Для получения конструкций, экспрессирующих только внеклеточный домен (ВКД) HER2 человека, для целей трансфекции и иммунизации, трансмембранный домен и ВКД HER2 амплифицировали с

помощью ПЦР и повторно клонировали в pVax1. Для целей трансфекции получали другую конструкцию в pDisplay путем амплификации ВКД HER2, в данной конструкции ВКД HER2 соединяли с трансмембранным доменом PDGFR.

- 5 *HER3 человека.* Полноразмерный кДНК-клон HER3 человека получали от Origene. Для получения конструкций, экспрессирующих только ВКД HER3 человека, для целей трансфекции и иммунизации, трансмембранный домен и ВКД HER3 амплифицировали с помощью ПЦР и повторно клонировали в pVax1. Дополнительно получали другую конструкцию в pVax1, посредством которой ВКД
- 10 HER3 соединяли с трансмембранным доменом PDGFR. Все последовательности проверяли путем сравнения с эталонной последовательностью NCBI NM\_001982.3

- Внеклеточный домен HER2 яванского макака* амплифицировали с помощью ПЦР по кДНК из нормальной ткани толстого кишечника яванского макака (Biochain).
- 15 Праймеры, используемые для амплификации HER2 яванского макака, описаны далее:
- Прямой праймер: AAGCTGGCTAGCACCATGGAGCTGGCGGCCTGGTAC  
 Обратный праймер: AATAATTCTAGACTGGCACGTCCAGACCCAGG.
- Полноразмерный амплифицированный продукт расщепляли с помощью NheI-XbaI
- 20 и впоследствии клонировали в соответствующие сайты pCDNA3.1. Клон секвенировали и выравнивали с доступными последовательностями макаки-резуса (XM\_002800451) для проверки правильности клона ErbB-2.

- Внеклеточный домен HER3 яванского макака* амплифицировали с помощью ПЦР по кДНК из нормальной ткани толстого кишечника яванского макака (Biochain).
- 25 Праймеры, используемые для амплификации HER3 яванского макака, описаны далее:
- Прямой праймер: AAGCTGGCTAGCACCATGAGGGCGAACGGCGCTCTG,  
 Обратный праймер: AATAATTCTAGATTACGTTCTCTGGGCATTAGC.
- 30 Полноразмерный амплифицированный продукт расщепляли с помощью NheI-XbaI и впоследствии клонировали в соответствующие сайты pCDNA3.1. Клон

секвенировали и выравнивали с доступными последовательностями макаки-резуса (ENSMMUP00000027321) для проверки правильности клона HER3.

5 За основу для *последовательности HER2 цыпленка* брали эталонную последовательность NM\_001044661.1. Химерные конструкции с заменой доменов получали путем замены доменов I - IV в последовательности HER2 цыпленка на домены I - IV человека. Последовательности, содержащие метку тус, оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих и синтезировали в Geneart.

10

За основу для *последовательности HER3 крысы* брали эталонную последовательность NM\_001044661.1. Химерные конструкции с заменой доменов получали путем замены доменов I - IV в последовательности HER3 крысы на домены I - IV человека. Последовательности, содержащие метку тус, оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих и синтезировали в Geneart.

15

Получение линий клеток, экспрессирующих на избыточном уровне HER2 и HER3.

20 Для получения линий клеток, которые экспрессируют высокие уровни HER3 на своей поверхности, получали вектор экспрессии в млекопитающем путем расщепления рестриктазами *NotI* и *KpnI* с получением полноразмерного HER3. Затем указанный фрагмент клонировали в соответствующие сайты вектора pCDNA3.1(-)/hygro. Вектор экспрессии полноразмерного HER2 и HER3, кодирующий ген устойчивости к неомицину, использовали для получения линий

25 клеток, которые экспрессируют высокие уровни HER2 на своей поверхности. Перед трансфекцией указанные плазмиды линеаризовали путем расщепления *SSpI* и *FspI*. Обои векторами по отдельности трансфицировали клетки K562 и получали стабильные пулы клеток после селекции с применением антибиотика.

30 Полученные линии клеток (K562-HER2 и K562-HER3) экспрессировали высокие уровни HER2 и HER3 на своей поверхности.

Иммунизация

*Иммунизация HER2.* Использовали четыре разных стратегии иммунизации. В когорте №А шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER2, в 200 мкл, путем интраперитонеальной инъекции.

5 Затем мышам вводили бустерные дозы 20 мкг белка ErbB-2-Fc (RND Systems), растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной инъекции в день 14, с последующими бустерными дозами  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER2, в 200 мкл, в дни 28 и 42. В когорте №С шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER2, путем интраперитонеальной инъекции. Затем мышам вводили бустерные дозы  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER2, в 200 мкл, путем интраперитонеальной инъекции в день 14, с последующими бустерными дозами 20 мкг белка ErbB-2-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной инъекции в день 35 и последней бустерной дозой 20 мкг

10 белка ErbB-2-Fc, растворенного в 200 мкл ФБР, путем интраперитонеальной инъекции в день 49. В когорте №Е шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали 20 мкг белок ErbB-2-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной инъекции. Затем вводили бустерные дозы 20 мкг белка ErbB-2-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной

15 инъекции в день 14 и 28 и последнюю бустерную дозу 20 мкг белка ErbB-2-Fc, растворенного в 200 мкл ФБР, путем интраперитонеальной инъекции в день 42. В когорте №G шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали посредством вакцинации ДНК в Genovac (Фрайбург, Германия), в соответствии с их протоколами. Предложенные не содержащие эндотоксинов векторы, используемые для вакцинации ДНК, кодировали трансмембранную и внеклеточную часть HER2, клонированную в pVax1. Затем вводили бустерные дозы ДНК в день 14, 28 и 66.

25

*Иммунизация HER3.* Использовали четыре разных стратегии иммунизации. В когорте №В шесть (C57Bl/6) мышей иммунизировали  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER3, в 200 мкл, путем интраперитонеальной инъекции.

30 Затем мышам вводили бустерные дозы  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER3, в 200 мкл, в дни 14, 28, 49 и 63. В когорте №D шесть

мышей C57Bl/6 иммунизировали  $2 \times 10^6$  клеток L929, временно трансфицированных HER3, путем интраперитонеальной инъекции в день 0, 14 и 28. Затем мышам вводили бустерные дозы 20 мкг белка ErbB-3-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной инъекции в день 49 и 5 последнюю бустерную дозу 20 мкг белка ErbB-3-Fc, растворенного в 200 мкл ФБР, путем интраперитонеальной инъекции в день 66. В когорте №F шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали 20 мкг белка ErbB-3-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем интраперитонеальной инъекции. Затем мышам вводили бустерные дозы 20 мкг белка ErbB-3-Fc, растворенного в 125 мкл Titermax Gold, путем 10 интраперитонеальной инъекции в день 14 и 28 и последнюю бустерную дозу с 20 мкг белка ErbB-3-Fc, растворенного в 200 мкл ФБР, путем интраперитонеальной инъекции в день 42. В когорте №Н шесть мышей C57Bl/6 иммунизировали посредством вакцинации ДНК в Genovac (Фрайбург, Германия), в соответствии с их протоколами. Предложенные не содержащие эндотоксинов векторы, 15 используемые для вакцинации ДНК, кодировали трансмембранную часть PDGFR и внеклеточную часть HER3, клонированные в pVax1. Затем вводили бустерные дозы ДНК в день 14, 28 и 66.

#### **Определение титров антител.**

20 Титры антител против HER2 в сыворотке из иммунизированных мышей C57Bl/6 определяли с помощью ELISA на ВКД белка ErbB-2 (Bendermedsystems) и анализа FACS отрицательных по HER2 клеток K562, линии клеток MCF-7 с низкими уровнями экспрессии HER2 и клеток SKBR-3 и BT-474 с амплифицированным HER2. Титры антител против HER3 в сыворотке из иммунизированных мышей 25 C57Bl/6 определяли с помощью ELISA на белке ErbB-3-Fc и анализа FACS отрицательных по HER2 клеток K562, линии клеток MCF-7 с низкими уровнями экспрессии HER2 и клеток SKBR-3 и BT-474 с амплифицированным HER2. Титры антител против HER2 и HER3 в сыворотке перед умерщвлением животных представлены в таблице 1 и таблице 2, соответственно. У животных во всех 30 когортах развились ответы антител против HER2 или HER3.

#### **Выделение лимфоидной ткани.**

Из всех мышей, вакцинированных ДНК (когорты №G и №H), извлекали селезенку и дренирующие лимфатические узлы. Из всех тканей получали суспензии отдельных клеток, а затем ткани лизировали в реагенте Тризол. Селезенки извлекали из всех мышей из когорт №A - №F, за исключением одной мыши из когорты №C, которая погибла после первой бустерной инъекции. Из всех селезенок получали суспензии отдельных клеток и выделяли всю фракцию В-клеток, применяя процедуру разделения методом магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) либо путем обогащения CD19 (когорты № A, E, F), либо путем обеднения клетками, не относящимися к В-клеткам (когорты № B, C, D).

10

#### **Получение библиотек фагового дисплея из иммунизированных мышей**

Для каждой мыши конструировали одну фаговую библиотеку. Для этой цели использовали материал от всех мышей в каждой группе (5 или 6 мышей на группу) для получения фаговых библиотек с применением следующего подхода. Из каждой отдельной мыши выделяли РНК, синтезировали кДНК и проводили реакции ПЦР, специфические для семейства генов VH. Затем очищали все продукты ПЦР семейства VH от каждой мыши, определяли концентрацию ДНК, расщепляли и лигировали в вектор фагового дисплея, содержащий общую легкую цепь, для получения фаговой библиотеки химерных антител мыши/человека. Все фаговые библиотеки содержали  $> 10^6$  клонов с частотой встраивания  $> 85\%$ .

20

#### **Селекция фагов, несущих Fab-фрагменты, специфически связывающие HER2 и HER3**

Селекцию фрагментов антител проводили, применяя библиотеки фагового дисплея антител. Для селекции использовали библиотеки, полученные с применением иммунизации, и синтетические библиотеки (согласно описанию в de Kruif и др. Mol. Biol. (1995), **248**, 97-105).

25

### Селекция и скрининг фагов HER2

Фаговые библиотеки высвобождали с помощью хелперного фага VCS-M13 (Stratagene) и проводили два раунда селекции в иммунопробирках (Nunc), покрытых рекомбинантным белком. В первом раунде иммунопробирки покрывали

5 ВКД белка ErbB-2 (Bendermedsystems), тогда как во втором раунде иммунопробирки покрывали ErbB-2-Fc (RND Systems). Иммунопробирки блокировали 4%-ным раствором обезжиренного сухого молока (ELK). Библиотеки фагового дисплея антител также блокировали 4% ELK перед добавлением фаговой библиотеки в иммунопробирки. Инкубацию с фаговой библиотекой и белковым

10 покрытием в иммунных пробирках проводили в течение 2 ч при комнатной температуре при вращении. Иммунопробирки затем промывали от пяти до десяти раз 0,05% Tween-20 в ФБР, а затем промывали от 5 до 10 раз ФБР. Связанные фаги элюировали с применением 50 мМ глицина (pH 2,2), добавляли к E. coli XL-1 Blue и инкубировали при 37°C для инфицирования фагами. Впоследствии

15 инфицированные бактерии высевали на чашки с агаром, содержащие ампициллин, тетрациклин и глюкозу, и инкубировали при 37°C в течение ночи. После первого раунда колонии соскребали с чашек и объединяли, после чего высвобождали и амплифицировали с получением обогащенной библиотеки первого раунда. Затем проводили селекцию обогащенной библиотеки на ErbB-2-Fc (RND Systems),

20 применяя описанный выше протокол. После второго раунда селекции отбирали и высвобождали отдельные клоны с получением моноклональных препаратов фага с помощью набора Miniprep. Затем идентифицировали положительных клонов фага, связывающих ErbB2, с помощью FACS по связыванию с линией клеток рака молочной железы BT-474. Секвенировали гены VH из всех специфических к ErbB-

25 2 клонов. Перестройки гена VH определяли с помощью программного обеспечения VBASE2, чтобы идентифицировать уникальных клонов. Затем исследовали с помощью FACS связывание всех уникальных клонов в формате фага с клетками HEK293T (отрицательный контроль), клетками HEK293T, временно трансфицированными ErbB-2, и клетками BT-474.

30

### Селекция и скрининг фагов HER3

Фаговые библиотеки высвобождали с помощью хелперного фага VCS-M13 (Stratagene) и проводили два раунда селекции в иммунопробирках (Nunc), покрытых рекомбинантным белком. В обоих раундах селекции иммунопробирки покрывали ErbB-3-Fc (RND Systems), тогда как во втором раунде иммунопробирки покрывали ErbB-2-Fc (RND Systems). Для того чтобы преодолеть смещение отбора в сторону Fc-части слитого белка, оба раунда селекции на ErbB-3-Fc проводили в присутствии 150 мкг/мл IgG человека. Иммунопробирки блокировали 4% ELK. Библиотеки фагового дисплея антител также блокировали 4% ELK перед добавлением фаговой библиотеки в иммунопробирки. Инкубацию с фаговой библиотекой проводили в течение 2 ч при вращении. Иммунопробирки затем промывали от пяти до десяти раз 0,05% Tween-20 в ФБР, а затем промывали от 5 до 10 раз ФБР. Связанные фаги элюировали с применением 50 мМ глицина (pH 2,2), добавляли к *E. coli* XL-1 Blue и инкубировали для инфицирования фагами. Впоследствии инфицированные бактерии высевали на чашки с агаром, содержащие ампициллин, тетрациклин и глюкозу, и инкубировали при 37°C в течение ночи. После первого раунда колонии соскребали с чашек и объединяли, после чего высвобождали и амплифицировали фаги с получением обогащенной библиотеки первого раунда. Затем проводили селекцию обогащенной библиотеки на ErbB-3-Fc (RND Systems), применяя описанный выше протокол. После второго раунда селекции отбирали и высвобождали отдельные клоны с получением моноклональных препаратов фага с помощью набора MiniPrep. Положительных клонов фага идентифицировали с помощью FACS по связыванию с линией клеток рака молочной железы BT-474. Секвенировали гены VH из всех положительных клонов. Перестройки гена VH определяли с помощью программного обеспечения VBASE2, чтобы идентифицировать уникальных клонов. В анализе FACS исследовали связывание всех уникальных клонов в формате фага с клетками K562 (отрицательный контроль), стабильными клетками K562-HER3 и клетками BT-474. Всего проводили 36 раундов селекции на форматах антигенов ErbB-2 и ErbB-3. Все скрининговые процедуры селекции позволили получить 89 уникальных клонов Fab, направленных против HER2, и 137 уникальных клонов Fab, направленных против HER3. Fab считали уникальным на основании уникальной последовательности его HCDR3, указывающей на уникальное событие

рекомбинации VDJ. В некоторых случаях получали клональные варианты с идентичными HCDR3, различающимися CDR1 и/или CDR2. Из библиотек иммунизированных мышей отбирали кластеры клональных вариантов, содержащих замены в гене VH, отражающие варианты аффинности.

5

### **Селекция/определение характеристик антител**

#### **Получение моноклональных антител**

Гены VH уникальных антител, судя по последовательности гена VH и некоторым вариантам указанной последовательности, полученные из фаговых библиотек из иммунизированных мышей, клонировали в остов вектора IgG1. В указанном процессе использовали две различные продуцирующие линии клеток: клетки НЕК293Т и 293F Freestyle. Прикрепленные к субстрату клетки НЕК293Т культивировали в 6-луночных планшетах до конfluence, составляющей 80%. Клетки временно трансфицировали смесью индивидуальных ДНК с FUGENE и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции собирали супернатант и заменяли среду. Через четырнадцать дней после трансфекции супернатанты объединяли и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Sartorius). Стерильный супернатант хранили при 4°C.

Адаптированные для суспензионной культуры клетки 293F Freestyle культивировали во флаконах T125 на встряхиваемой платформе до достижения плотности  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки высевали при плотности  $0,3-0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки временно трансфицировали смесью индивидуальных стерильных ДНК с полиэтиленимином (PEI) и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции, собирали супернатант и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Sartorius). Стерильный супернатант хранили при 4°C.

#### **Получение биспецифических антител**

Биспецифические антитела получали, применяя собственную СНЗ-методику, обеспечивающую эффективную гетеродимеризацию и образование биспецифического антитела. В указанной СНЗ-методике для обеспечения

30

эффективного образования пары из двух разных молекул тяжелых цепей используют сообщающие определенный заряд точечные мутации в области СНЗ, согласно приведенному ранее описанию (PCT/NL2013/050294; опубликована как WO 2013/157954 A1).

5

### **Очистка IgG для функционального скрининга**

Очистку IgG проводили в малом масштабе (< 500 мкг), среднем масштабе (<10 мг) и большом масштабе (>10 мг), применяя аффинную хроматографию. Очистку в малом масштабе проводили в стерильных условиях в 24-луночных фильтровальных планшетах, применяя фильтрацию под вакуумом. Сначала подводили pH среды до pH 8,0, а затем полученный в малом масштабе продукт инкубировали с белком А на гранулах сефарозы CL-4В (50% в объемном отношении) (Pierce) в течение 2 ч при 25°C на встряхивающей платформе при 600 об/мин (встряхиватель для планшетов Heidolph). Затем гранулы собирали с помощью фильтрации под вакуумом. Гранулы промывали дважды в ФБР, pH 7,4. IgG элюировали при pH 3,0 с помощью 0,1 М цитратного буфера и фракцию IgG незамедлительно нейтрализовали с помощью Трис, pH 8,0. Замену буфера осуществляли путем центрифугирования, применяя многолуночные планшеты MultiScreen Ultracel-10 (Millipore). Образцы оказывались в конечном буфере ФБР, pH 7,4

15  
20

### **Проверка специфических к HER2/HER3 IgG**

В анализе FACS исследовали связывание антител с BT-474, HEK293Т и HEK293Т с повышенной экспрессией HER2 или HER3. Для этого клетки собирали, применяя трипсин, и разбавляли до  $10^6$  клеток/мл в буфере для FACS (ФБР/0,5%БСА/0,5 мМ ЭДТА). 1 -  $2 \times 10^5$  клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета со скругленным дном лунок. Клетки центрифугировали в течение 2 минут при 300 g при 4°C. Супернатант отбрасывали путем переворачивания планшета(-ов). Добавляли 50 мкл каждого образца IgG при концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки однократно центрифугировали, супернатант удаляли и клетки промывали дважды буфером для FACS. Добавляли 50 мкл разбавленных 1:100 антител мыши против IgG человека-PE (Invitrogen) и

25  
30

инкубировали в течение 30 - 60 минут на льду в темноте. После добавления буфера для FACS клетки однократно центрифугировали, супернатант удаляли и клетки промывали дважды буфером для FACS. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto с установленным модулем HTS. Связывание антител с клетками оценивали по средней интенсивности флуоресценции (MFI).

Для проверки способности к неспецифическому связыванию использовали анализ ELISA. Исследовали реакционную способность антител к HER2 и HER3 по отношению к антигенам фибриногену, гемоглобулину и столбнячному токсину. Для проверки способности к специфическому связыванию HER2 и HER3, исследовали связывание указанных антител с очищенными рекомбинантными внеклеточными доменами EGFR, HER2, HER3 и HER4. Планшеты MAXISORP™ для ELISA покрывали антигенами в течение ночи. Лунки планшетов для ELISA блокировали ФБР (pH 7,2), содержащим 5% БСА, в течение 1 часа при 37°C. Прошедшие селекцию антитела исследовали в двух повторах при концентрации 10 мкг/мл, разбавленными в ФБР-2% БСА, и позволяли связываться в течение 2 часов при 25°C. В качестве контроля одновременно проводили указанную процедуру с антителом, специфическим к нанесенным антигенам, и с антителом отрицательного контроля. Планшеты для ELISA промывали 5 раз в ФБР-Т (ФБР-0,05% Tween 20 в объемном отношении). Связанный IgG детектировали с помощью разведенного 1:2000 конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела (антител козы против мыши, BD) и позволяли связываться в течение 2 часов при 25°C. Планшеты для ELISA промывали 5 раз в ФБР-Т (ФБР-0,05% Tween 20) и связанный IgG детектировали посредством измерения ОП на 492 нм.

### 25 **Группирование эпитопов, специфических к HER2/HER3 IgG.**

Антитела в панели антител против HER2 группировали на основании их способности взаимодействовать с ВКД HER2, полученным из других видов (мыши, цыпленка), и на основании их связывания со специфическими доменами в молекуле HER2, т.е., с доменами I, II, III и IV, с применением химерных конструкций.

Антитела в панели антител против HER3 группировали на основании их способности взаимодействовать с ВКД HER3, полученным из других видов

(яванский макак, крыса), и на основании их связывания со специфическими доменами в молекуле HER3, т.е., с доменами I, II, III и IV, с применением химерных конструкций.

Для данной цели клетки CHO-K1 временно трансфицировали соответствующими  
 5 конструкциями, применяя смеси липофектамин/ДНК. В химерной конструкции с заменой доменов, домены HER2 цыпленка или HER3 крысы заменяли на соответствующие домены из человека. Связывание специфических антител измеряли с помощью FACS. Экспрессию конструкций подтверждали, применяя антитело против мус. FACS-окрашивание с трастузумабом включали в качестве  
 10 контроля специфического связывания с доменом IV. Антитела в каждой группе можно упорядочить на основании интенсивности окрашивания (MFI).

Панель из 65 антител к HER2 можно разделить на семь групп (таблица 3).

1. Специфические в отношении домена I (25)
2. Специфические в отношении домена II (2)
- 15 3. Специфические в отношении домена III (23)
4. Специфические в отношении домена IV (7)
5. Специфические в отношении домена IV и вступающие в перекрестную реакцию с доменом мыши (2)
6. Вступающие в реакцию со всеми конструкциями (2)
- 20 7. Вступающие в реакцию только с HER2 человека (4)

### **Конкурирование с трастузумабом**

Два антитела, отнесенные к группе, вступающей в реакцию с доменом IV HER2, ингибировали пролиферацию клеток SKBR-3. У обоих антител были аналогичные  
 25 области CDR3 за исключением одной отличающейся аминокислоты. Исследовали способность одного антитела PG1849 конкурировать с трастузумабом в конкурентном анализе ELISA. В данном ELISA планшеты покрывали Fc-HER2 и инкубировали с антителом IgG при концентрации 15 мкг/мл. После инкубации в течение 15 минут фаги оставляли для инкубации еще на один час. После этого фаги  
 30 детектировали. В таблице 4 показано, что PG1849 и трастузумаб могут

одновременно связываться с HER2, поскольку в ходе ELISA не наблюдали потери сигнала. Истинную конкуренцию наблюдали только когда одни и те же фаг и антитело объединяли в указанном анализе.

- 5 Панель из 124 антител к HER3 можно разделить на пять групп (таблица 5):
1. Высокая реакционная способность в отношении домена III, реакционная способность в отношении крысы и мыши и незначительная реакционная способность в отношении домена IV (8)
  - 10 2. Высокая реакционная способность в отношении домена III, реакционная способность в отношении крысы, человека и яванского макака, незначительная реакционная способность в отношении домена IV (8)
  3. Вступающие в реакцию только с HER3 крысы, яванского макака и человека (43)
  - 15 4. Вступающие в реакцию только с HER3 человека (32)
  5. Вступающие в реакцию со всеми конструкциями (33)

#### **Анализ пролиферации линий клеток**

Клетки SK-BR-3 культивировали в DMEM-F/12, дополненной L-глутамином и 10% термоинактивированной ФБС. Клетки VxPC-3-luc2 культивировали в RPMI1640, дополненной 10% термоинактивированной ФБС. Клетки MCF-7 культивировали в RPMI1640, дополненной 100 мкМ NEAA, 1 mM пирувата натрия, 4 мкг/мл инсулина и 10% термоинактивированной ФБС.

25 Для анализа пролиферации клеток SK-BR-3 субконфлюэнтные культуры клеток промывали ФБР, трипсинизировали и инактивировали трипсин добавлением культуральной среды. Клетки разбавляли до  $6 \times 10^4$  клеток/мл в культуральной среде. Антитела разбавляли до концентрации 10 и 1 мкг/мл и добавляли в объем 100 мкл в 96-луночные планшеты с черным дном (ABgene AB-0932). Клетки добавляли при плотности 6000 клеток/лунку. Клетки культивировали в течение 30 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), следуя инструкциям производителя, и инкубировали в течение

6 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% в темноте. Измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм. Степень ингибирования роста сравнивали с таковой для такой же концентрации трастузумаба (таблица 6).

- 5 Для анализа пролиферации клеток MCF-7 и VxPC-3-luc2 субконфлюэнтные культуры клеток промывали ФБР, трипсинизировали и инактивировали трипсин добавлением культуральной среды. Клетки промывали дважды большими объемами аналитической среды (среды RPMI 1640, содержащей 0,05% БСА и 10 мкг/мл голотрансферрина).
- 10 Клетки MCF-7 разбавляли до  $5 \times 10^4$  клеток/мл в культуральной среде. Антитела разбавляли до концентрации 10 и 1 мкг/мл и добавляли в объем 100 мкл в 96-луночные планшеты с черным дном (ABgene AB-0932). Клетки добавляли при плотности 5000 клеток/лунку в присутствии конечной концентрации 1 нг/мл человеческого рекомбинантного домена EGF NRG1-бета 1 человека/HRG1-бета 1
- 15 (396-HB-050 RND). Домен EGF NRG1-бета 1 человека/HRG1-бета 1 далее в данном тексте будут называть HRG. Клетки культивировали в течение 5 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), следуя инструкциям производителя, и инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% в темноте. Измеряли флуоресценцию
- 20 при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм. Степень ингибирования роста сравнивали с таковой для такой же концентрации №Ab6 (таблица 7).

- Анализ пролиферации VxPC-3-luc-2 использовали для скрининга биспецифических
- 25 антител. Клетки VxPC-3-luc-2 разбавляли до  $8 \times 10^4$  клеток/мл в культуральной среде. Антитела разбавляли до концентрации 10 и 1 мкг/мл и добавляли в объем 100 мкл в 96-луночные планшеты с черным дном (ABgene AB-0932). Клетки добавляли при плотности 8000 клеток/лунку в отсутствие или в присутствии конечной концентрации 10 нг/мл HRG человека. Клетки культивировали в течение
- 30 4 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), следуя инструкциям производителя, и инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% в темноте. Измеряли

флуоресценцию при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм.

Для того чтобы минимизировать краевые эффекты, внешние лунки 96-луночных планшетов полностью заполняли ФБР.

5

### **Упорядочивание по аффинности специфических к HER2 IgG**

Мы использовали способ, описанный у Devash (PNAS, 1990), для упорядочивания антител в анализе ELISA с ограниченным количеством антигена. Применение пониженных концентраций антигена для покрытия устраняет наблюдаемые

10 перекрестные реакции и может использоваться для детектирования антител с высокой аффинностью/авидностью. Следовательно, концентрацию антигена на твердой подложке постепенно уменьшали, чтобы исследовать слабую иммунологическую реакционную способность. Серийными титрами ВКД белка ErbB-2, начиная с 2,5 мкг/мл и до 0,019 мкг/мл, покрывали планшеты для ELISA

15 MAXISORP™ в течение ночи. Лунки планшетов для ELISA блокировали ФБР (pH 7,2), содержащим 5% БСА, в течение 1 часа при 37°C. Прошедшие селекцию антитела исследовали в двух повторах при концентрации 10 мкг/мл, разбавленными в ФБР-2% БСА, и позволяли связываться в течение 2 часов при 25°C. В качестве контроля одновременно проводили указанную процедуру с

20 антителом, специфическим к нанесенным антигенам, и с антителом отрицательного контроля. Планшеты для ELISA промывали 5 раз в ФБР-Т (ФБР-0,05% Tween 20 в объемном отношении). Связанный IgG детектировали с помощью разведенного 1:2000 конъюгированного с HRP антитела (козы против IgG мыши, BD Biosciences) и позволяли связываться в течение 2 часов при 25°C. Планшеты

25 для ELISA промывали 5 раз в ФБР-Т (ФБР-0,05% Tween 20) и связанный IgG детектировали посредством измерения ОП на 492 нм. PG1849, PG2916, PG2926, PG2930, PG2971, PG2973, PG3004 и PG3031 исследовали в анализе ELISA при титровании антигеном HER2 (фиг. 1).

### **30 Связывание генов VH HER2 с различными легкими цепями каппа**

Для того чтобы исследовать связывание VH HER2, полученных из различных библиотек фагового дисплея, панель антител к HER2 клонировали и

экспрессировали в контексте другой цепи каппа VK, т.е. VL из MEND7945A. Полученные IgG подвергали анализу FACS на клетках K562 и стабильных клетках K562-HER2. Гены VH, полученные из комбинаторных библиотек и некомбинаторных библиотек, приведены в таблице 8. Все цепи VH MF2971, MF3958, MF2916, MF2973, MF3004, MF3025, MF3031 можно скомбинировать с легкой цепью MEND7945A без значительной утраты специфичности и связывания антигена, что наблюдают при комбинировании с общей легкой цепью IGKV1-39. Цепь VH MF1849 не удалось скомбинировать с вариантом легкой цепи каппа с сохранением специфичности и связывания антигена.

10

### **Другие антитела к HER2 и HER3**

Антитела, которые ингибируют функцию HER2 или HER3, известны в данной области. Дополнительные антитела сконструировали согласно опубликованной информации и экспрессировали в клетках 293F Freestyle. Антитела против HER2 пертузумаб и трастузумаб получали на основании информации, раскрытой в US2006/0212956 A1 (Genentech). Антитело против HER3 №Ab6 получали на основании информации, раскрытой в WO 2008/100624 (Merrimack Pharmaceuticals, Inc.) и повторно клонировали в вектор с остовом IgG1. Информацию об антителах против HER3 1-53 и U1-59 получали из US 7705103 B2 (U3 Pharma AG). Информацию об антителе против HER3 LJM716 получали из US 2012/0107306. Информацию для конструирования антитела «два в одном» против EGFR и против HER3 MEND7945A получали из WO2010/108127.

20

### **Скрининг биспецифических антител против HER2xHER3**

VH из панели антител против HER2 и HER3 повторно клонировали в нагруженные сконструированные векторы таким образом, что при экспрессии тяжелых цепей антитела происходила принудительная гетеродимеризация тяжелых цепей, приводящая к образованию биспецифических антител после трансфекции. Использовали три различные стратегии при комбинировании плеч против HER2 и HER3 в биспецифическом формате IgG:

30

1. HER2 (блокирование лиганд-независимого роста) x HER3 (блокирование лиганд-независимого роста)

2. HER2 (блокирование лиганд-независимого роста) x HER3 (блокирование лиганд-зависимого роста)

3. HER2 из различных групп эпитопов x HER3 (блокирование лиганд-зависимого роста)

5

В некоторых биспецифических комбинациях антитела, полученные в группах 2 и 3, перекрывались с антителами группы 1.

Всего было получено и очищено 495 биспецифических антител в 24-луночном формате. Исследовали способность всех антител ингибировать пролиферацию экспрессирующей HER2 и HER3 линии клеток поджелудочной железы VxPC-3-luc-2 (Calliper). Эффективность антител определяли в HRG-зависимых и HRG-независимых условиях путем монохромного скрининга, при этом антитела присутствовали при концентрации 10 и 1 мкг/мл. В анализ включали трастузумаб в качестве эталонного антитела, а также антитело отрицательного контроля при таких же концентрациях. Функциональная активность 80 проявивших лучшую биспецифичность к HER2xHER3 антител (на основании комбинированного ингибирования) при концентрации 1 мкг/мл показана на фигуре 2.

Выбирали, воспроизводили и очищали в 24-луночном формате антитела (всего 40), которые проявили наиболее высокую ингибиторную активность по сравнению с антителом положительного контроля, и повторно исследовали путем монохромного скрининга VxPC-3-luc-2 при концентрациях 10 и 1 мкг/мл. Указанные антитела дополнительно титровали в анализе MCF-7 в HRG-зависимых условиях и сравнивали с комбинацией трастузумаба и пертузумаба (1:1) и антителом отрицательного контроля. На фигуре 3 приведен пример кривых титрования трех биспецифических антител по сравнению с исходным антителом против HER3 и комбинацией трастузумаб + пертузумаб. Исходные моноклональные антитела показаны на верхнем изображении, а биспецифические антитела показаны на нижнем изображении (фигура 3).

IC<sub>50</sub> для биспецифических антител, моноклональных антител и антител сравнения рассчитывали, применяя нелинейный регрессионный анализ, с помощью программного обеспечения Prism. В программном обеспечении Graph pad перечислены значения IC<sub>50</sub> для биспецифических антител в анализе на MCF-7 и их

ингибиторная активность в анализе ВхРС3 для сравнения. Выявили более эффективную ингибирующую активность у панели из 12 биспецифических антител против HER2xHER3 по сравнению с комбинацией трастузумаб + пертузумаб. Кроме того, биспецифические антитела были в той же или большей степени эффективны по сравнению с исходным моноклональным антителом PG3178 (таблица 9).

Биспецифические антитела, которые ингибировали зависимый от лиганда рост клеток, состояли из плеч против HER2 в комбинации с плечами против HER3: 3178, 3163, 3099 и 3176. Плечи как против HER2, так и против HER3 наиболее эффективных биспецифических антител также, как и бивалентное моноклональное антитело, были способны ингибировать независимую от лиганда пролиферацию SKBR-3 (оба плеча против HER2 и HER3) (таблица 6) или зависимую от лиганда пролиферацию MCF-7 (плечи против HER3) (таблица 7). Большинство эффективных антител состояли из плеча против HER2, распознающего домен I, в комбинации с антителом против HER3 - 3178.

### **Ингибирование роста опухоли ВхРС-3-luc2**

Антитела, описанные в таблице 9, исследовали в модели ксенотрансплантата поджелудочной железы ВхРС-3-luc2. Линия клеток ВхРС-3-luc2 экспрессирует как HER2, так и HER3, и ее считают линией клеток, экспрессирующей низкие уровни HER2. Самкам мышей CB17 SCID в возрасте 8 - 10 недель в начале исследования ортотопически трансплантировали в поджелудочную железу  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток в объеме 20 мкл. Для этого мышам получали анестезию и клали на правый бок, чтобы обеспечить доступ к левому боку, и делали разрез длиной 0,5 см в области левого бока. Поджелудочную железу и селезенку выводили на поверхность и в субкапсулярное пространство хвоста поджелудочной железы вводили путем инъекции  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток в объеме 20 мкл. Через одну неделю после имплантации получали данные биолюминесценции (BLI). За 15 минут до визуализации всем мышам вводили интраперитонеальные (и/п) инъекции 150 мг/кг люциферина (D-люциферин-EF (без эндотоксинов), калиевая соль, номер в каталоге E6552, Promega). Визуализацию BLI осуществляли один или два раза в неделю, используя вид слева. Животных с резко отклоняющимися значениями – на

основании BLI/объема опухоли – исключали, и мышей случайным образом распределяли в группы по 7 мышей каждая. Лечение начинали на 8 день эксперимента. Животным в группе лечения антителом вводили дозу 30 мг/кг антитела еженедельно в течение 3 последовательных недель (дни 0, 7, 14 и 21). В 5 день 0 лечения животные дважды получали нагрузочную дозу, т.е., 60 мг антитела/кг. Последнюю визуализацию осуществляли в день 31.

Две модели ксенотрансплантатов VxPC-3-luc2 тестировали с различными панелями биспецифических антител и исходными антителами. В первой модели ксенотрансплантата VxPC-3-luc2 (фигура 4) одна группа получала антитело отрицательного контроля против RSV (Ctrl IgG), одна группа получала контрольное антитело трастузумаб и одна группа получала антитело положительного контроля трастузумаб + пертузумаб (1:1 в объемном отношении). Остальные семь групп получали одно из моноклональных (PG) или биспецифических (PB) антител: PG3004, PG3178, PB3566, PB3710, PB3443, PB3448 10 и PB3441. Подробная информация о составе биспецифических антител приведена в таблице 9.

Все пять исследованных биспецифических антител были способны ингибировать рост опухоли. Средняя масса опухоли (BLI) у животных, которых лечили биспецифическим антителом против HER2 x HER3, была сходна с таковой у 20 животных, которых лечили комбинацией трастузумаб + пертузумаб (фиг. 4).

Во второй модели ксенотрансплантата VxPC-3-luc2 (фигура 5) одна группа получала антитело отрицательного контроля против RSV (Ctrl IgG) и одна группа получала антитело положительного контроля - комбинацию трастузумаб + 25 пертузумаб (1:1 в объемном отношении). Пять остальных групп получали одно из антител PG3163, PB3986, PB3990, PB4011 и PB3883. Подробная информация о биспецифических антителах PB приведена в таблице 9. Данные биспецифические антитела содержали три разных связывающих HER3 плеча в комбинации с одним и тем же плечом к HER2 MF2971 и дополнительное плечо к HER2 в комбинации со 30 связывающим HER3 плечом MF3163. В данном эксперименте у опухолей в контрольной группе не выявили такого же уровня ускоренного роста, как в первом эксперименте, что затруднило интерпретацию результатов. Тем не менее,

биспецифические антитела против HER2xHER3 PB3883 и PB3990 обладали ингибиторной активностью, аналогичной таковой у комбинации трастузумаб + пертузумаб (фиг. 5).

5 На основании полученных *in vivo* и *in vitro* результатов выбрали панель биспецифических антител, из которых плечи против HER2 состояли из MF2971, MF3004, MF1849 и плечо против HER3 состояло из MF3178. Плечи MF2971 и MF3004 были мышиноного происхождения и были гуманизированы.

#### 10 **Связывание биспецифического антитела против HER2xHER3 по сравнению с таковым у исходных моноклональных антител**

Связывание биспецифических антител против HER2xHER3 по сравнению с таковым у их исходных аналогов определяли путем анализа FACS. FACS проводили на клетках VxPC-3-luc2 и клетках MCF-7 с серийными титрами антител в диапазоне 2,5 мкг/мл – 0, 01 мкг/мл. Панель исследуемых антител состояла из 15 биспецифического антитела PB3566 и исходных антител: антитела против HER3 PG3178 и антитела против HER2 PG3004. Результаты MFI наносили на график, и полученные графики для обеих линий клеток показали, что биспецифическое PB3566 более эффективно связывается с обеими линиями опухолевых клеток, чем антитело против HER3 PG3178 и антитело против HER2 PG3004 (фиг. 6)

20

#### **Гуманизирование MF2971 и MF3004**

MF2971 и MF3004 гуманизировали в соответствии с методикой, известной в данной области.

25 Всего семь гуманизированных/деиммунизированных вариантов последовательности MF2971 экспрессировали, подтверждали и описывали *in vitro* как моноклональные и в биспецифическом формате в комбинации со специфическим к HER3 антителом MF3178. То же самое осуществляли для семи вариантов последовательностей MF3004, которые получали путем замены HCDR3 MF2971 в указанных семи вариантах MF2971 на HCDR3 из MF3004. 30 Анализировали экспрессию, целостность, термическую стабильность и функциональную активность всех гуманизированных вариантов. На основании продукции, целостности, стабильности и функциональной целостности был выбран

вариант MF2971 (2971-var2) как оптимальный гуманизированный вариант VH для использования в биспецифическом формате с MF3178. Данный вариант 2971-var2 был переименован в MF3958. Биспецифическая комбинация MF3958xMF3178 против HER2xHER3 позволила получить PB4188.

5

### **Получение в крупном масштабе, очистка и аналитические исследования PB4188**

Адаптированные для роста в суспензионной культуре клетки 293F Freestyle культивировали в колбах Эрленмейера на встряхиваемой платформе до достижения плотности  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки высевали колбы Эрленмейера емкостью 4 л при плотности  $0,3 - 0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Клетки временно трансфицировали смесью индивидуальных стерильных ДНК с PEI и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции собирали кондиционированную среду, содержащую биспецифическое антитело, путем низкоскоростного центрифугирования в течение 5 минут при 1000 g, а затем высокоскоростного центрифугирования в течение 5 минут при 4000 g. Собранный кондиционированную среду концентрировали на кассете Sartorius Hydrosart с отсечением по молекулярной массе 5 кДа до объема, составляющего приблизительно 600 мл, и затем проводили диафильтрацию против 4 л ФБР.

Антитела связывали на колонке с ~35 мл MabSelectSure XL (11°C). Специфически связанные с белком А белки удаляли путем промывания колонки в режиме обратного потока 150 мл ФБР, 150 мл ФБР, содержащим 1 М NaCl, 100 мл ФБР. Связанные антитела элюировали, применяя 100 мМ цитрат, pH 3,0 в режиме обратного потока и собирали фракции объемом 5 мл в пробирки емкостью 10 мл, содержащие 4 мл Tris, pH 8,0, для нейтрализации. Элюированные антитела затем очищали гель-фильтрацией, применяя колонку Superdex 200 50/1000. Очищенное антитело стерилизовали фильтрацией, применяя шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Концентрацию IgG определяли путем измерения ОП на 280 нм и рассчитывали концентрацию белка на основании последовательности аминокислот. Исследовали агрегацию (ВЭЭХ) и чистоту (ЭФ в ПААГ/ДСН, нативная масс-спектрометрия (нМС), ИОХ и ИЭФ) белков. Образцы белков хранили при -80°C.

10  
15  
20  
25  
30

### **Очистка IgG для аналитических исследований и исследований ксенотрансплантатов.**

Очистку в среднем масштабе проводили на системе АКТА 100 Explorer, применяя колонки HiTrap MabSelect Sure и обессоливающие колонки HiTrap. Образцы загружали со скоростью 5 мл/мин. Колонку промывали 2 объемами колонки ФБР. IgG элюировали при pH 3,0 с помощью 0,1 М цитратного буфера. Затем образец обессоливали, и он оказывался в конечном буфере ФБР, pH 7,4. Полученные IgG фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Sartorius). Концентрацию IgG измеряли, применяя систему Octet с сенсорами белка А. Исследовали агрегацию (ВЭЭХ) и чистоту (ЭФ в ПААГ/ДСН, нМС, ИОХ и ИЭФ) белков. Образцы белков хранили при -80°C.

### **Аналитические характеристики PB4188**

PB4188 (MF3958xMF3178) подвергали анализу с применением ВЭЭХ и КО-ВЭЖХ (колонка TSK gel-STAT, диаметр частиц 7 мкм, внутренний диаметр 4,6 мм x длина 10 см). Аналитический профиль PB4188 в целом согласовывался с поведением нормального моноспецифического IgG1, такого как исходное плечо против HER2 PG3958 и моноклональное контрольное антитело против RSV (фиг. 7).

### **Определение аффинности.**

Аффинность моновалентного связывания антител PB4188 и PB3448 с рекомбинантными HER2 и HER3 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР, Biacore T100). Для проведения всех описанных экспериментов применяли Biacore™ T100 (GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Подготовку поверхности сенсора и анализ взаимодействия проводили при 25 °C. Буфер и реагенты Biacore приобретали у GE Healthcare. Поверхность сенсорного чипа CM5 покрывали ErbB2-Fc и ERbB3-Fc(RND) в калий-ацетатном буфере (pH 5,5) на целевом уровне иммобилизации 500 RU. Подвижный буфер представлял собой HBS (забуференный HEPES солевой раствор): 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% Tween-20, стерилизованный фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Биспецифические антитела разбавляли до 100, 50, 20, 10, 1 и 0,1 нМ в

HBS и пропускали с высокой скоростью потока (30 мкл/мин) через поверхность сенсорного чипа CM5 со связанными антигенами. В программном обеспечении BIAevaluation модель аппроксимации кривой для моновалентного взаимодействия 1:1 позволяла определить значения аффинности плеч HER2 (моновалентное взаимодействие), значения аффинности плеч HER2 можно было определить. 5  
Вследствие низкой скорости диссоциации плеча HER3, аффинность невозможно было определить. Для определения аффинности плеча HER3 сенсорный чип CM5 покрывали PB4188 при целевом уровне иммобилизации 500 RU. Антигены Her2-Fc и Her3-Fc разбавляли до 100, 50, 20, 10, 1 и 0,1 нМ в HBS и пропускали с высокой 10  
скоростью потока (40 мкл/мин) через поверхность со связанным PB4188. Для определения значений  $k_{on}$  и  $k_{off}$  применяли программное обеспечение BIAevaluation в сочетании с моделью, учитывающей то, что поверхность сенсорного чипа покрывали моновалентной молекулой, и то, что антиген ErbB-3-Fc представлял собой бивалентную молекулу. Значения аффинности антител PB4188 и PB3448 15  
представлены в таблице 10.

#### **Определение аффинности PB4188 на клетках.**

Значения аффинности связывания также определяли путем измерения аффинности стационарной культуры клеток, применяя клетки BT-474 и SK-BR-3. 20  
Анализировали четыре IgG: 1) PB4188 (биспецифическое против HER2xHER3), содержащее антитело против HER2 3958 и антитело против HER3 3178; 2) PB9215 (биспецифическое против HER3xТТ), содержащее антитело против HER3 3178 и антитело против ТТ (столбнячного токсоида) 1337; 3) PB9216 (биспецифическое против HER2xТТ), содержащее антитело против HER2 3958 и антитело против ТТ 25  
1337; 4) герцептин (моноспецифическое против HER2). IgG метили радиоактивным  $^{125}\text{I}$ , используя предварительно покрытые пробирки для иодирования IODO-GEN® Precoated Iodination Tubes (Pierce) и прилагаемые инструкции. Меченый IgG разбавляли до активности  $\sim 1-2 \times 10^8$  имп/мин/мл в 25 мМ Трис-HCl, 0,4 М NaCl, 0,25% БСА, 5 мМ ЭДТА, 0,05% NaN<sub>3</sub>. Концентрации белка определяли с помощью 30  
набора для анализа белка BCA Protein Assay Kit (Pierce). Анализ методом проточной цитометрии меченых и немеченых IgG с

применением клеток BT-474 и SK-BR-3 показал отсутствие или только незначительные признаки снижения связывания после внесения метки. Измерения аффинности в клетках стационарной культуры проводили, как описано далее. Клетки высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали при 4°C с различными концентрациями меченого IgG. Несвязанные радиоактивные частицы удаляли через 4 часа и измеряли связанную с клеткой радиоактивность, применяя счетчик гамма-излучения колодезного типа. Неспецифическое связывание измеряли путем добавления блокирующей рецептор концентрации (100-кратный избыток) немеченого антитела. Каждое условие исследовали в трех повторах и проводили по три независимых эксперимента на антитело. Значения  $K_D$  рассчитывали на основании нелинейной регрессионной модели, которая компенсирует неспецифическое связывание, применяя Prism 6.0d (программное обеспечение GraphPad). Графики, содержащие аппроксимированные кривые для связывания IgG против HER2xHER3 (PB4188) с обеими линиями клеток, приведены на фигуре 20. Полученные значения  $K_D$  для всех 24 тестов, включая средние значения, приведены в таблице 12. Вкратце, средние значения  $K_D$ , определенные с применением клеток BT-474 и SK-BR-3, составляли 3,2 и 2,0 нМ для HER2xHER3, 3,7 и 1,3 нМ для герцептина, 3,9 и 2,3 нМ для HER2xТТ, и 0,23 и 0,99 нМ для HER3xТТ, соответственно. Таким образом, продемонстрировали более высокую аффинность PB4188 к HER3, чем к HER2, что отличает его от биспецифической молекулы против HER2xHER3 - MM-111, которая направленно взаимодействует с HER2 с большей аффинностью, чем с HER3.

## **Антипролиферативная активность в отношении клеток рака молочной железы с амплифицированным HER2**

### *ЛМТ-1* в мягком агаре

Исследовали эффективность PB3448 и PB4188 в отношении ингибирования роста устойчивых к трастузумабу клеток ЛМТ-1 в мягком агаре. Для данной цели подготавливали 96-луночные планшеты для суспензионных культур клеток. Наливали и оставляли для отверждения 100 мкл мягкого агара для получения слоя на дне (конечная концентрация 0,6% в полной среде). Затем сверху добавляли 50

мкл мягкого агара для получения верхнего слоя (конечная концентрация 0,4%), содержащего 10000 клеток JIMT-1/лунку, отверждали и такие 96-луночные планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 10% CO<sub>2</sub>. На следующий день добавляли антитело отрицательного контроля, пертузумаб + трастузумаб (1:1 в 5  
объемном отношении), PB3448 и PB4188 в среде DMEM в полулогарифмических разведениях с концентрациями в диапазоне 10 - 0,003 мкг/мл. Затем планшеты инкубировали в инкубаторах для культур клеток в течение 8 дней. Наконец, клетки инкубировали с Alamar Blue в течение 3 - 5 ч при 37 °C и определяли интенсивность флуоресценции (возбуждение: 560 нм; испускание: 590 нм). Представлен пример 10  
дозозависимого ингибирования пролиферации JIMT-1 антителами PB3448 и PB4188 (фигура 8).

#### *BT-474 и SKBR-3 в матригеле*

Исследовали эффективность PB3448 и PB4188 в отношении ингибирования роста 15  
клеток BT-474 и клеток SKBR-3. Клетки исследовали в компании Ocello, расположенной в Лейдене, Нидерланды, которая выращивает клетки в трехмерном матригеле и использует анализ главных компонент, чтобы отличить необработанные клетки от обработанных клеток. 2000 клеток SK-BR-3 или 2250 клеток BT474 высевали в 15 мкл матригеля на лунку в 384-луночный планшет (Greiner 781091). На следующий день в культуральную среду добавляли 20  
полулогарифмические разведения антител в диапазоне концентраций от 10 до 0,003 мкг/мл в отсутствие или в присутствии 5 нг/мл HRG. Тестируемые антитела включали антитело отрицательного контроля, пертузумаб + трастузумаб (1:1 в объемном отношении), PB3448, PB4188 и биспецифическое антитело «два в 25  
одном» против EGFRxHER3 - MENH7945A. Дополнительно включали дозозависимое разведение HRG в качестве положительного контроля. Каждую дозу исследовали в четырех повторах. Клетки инкубировали в течение 7 дней в инкубаторе для культур клеток при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки фиксировали и актиновый цитоскелет клеток окрашивали фаллоидином, а ядра окрашивали 30  
красителем Хехст. Затем получали флуоресцентные изображения на разных уровнях геля (серия срезов по оси Z) и совмещали полученные изображения. Измеряли широкий спектр морфологических признаков (всего 800). Для анализа

выбирали только признаки, которые отличались при обработке средой и при обработке HRG. Признаки, которые были связаны с ростом, средняя площадь сфероидов и количество ядер на сфероид наиболее значительно различались при обработке средой и при обработке HRG. Проводили как многопараметрический, так и однопараметрический анализы. Для однопараметрических измерений выполняли t-тесты для сравнения обработки (HRG или антителом) со средой. Определяли P-значения для каждой точки. Анализ главных компонент (АГК), способ обнаружения низкоразмерных комбинаций данных с высокой размерностью, на которые приходится большая часть вариативности, применяли в отношении концентраций антител для построения графиков данных. На фигуре 9 продемонстрирован эффект комбинации пертузумаб + трастузумаб (1:1 в объемном отношении), PB3448 и PB4188 в присутствии HRG. Для обеих линий клеток рака молочной железы с амплифицированным HER2 выявили более высокую активность PB4188 по сравнению с комбинацией пертузумаб + трастузумаб, PB3448 и антителом «два в одном» MEHD7945A в присутствии HRG.

#### **Превосходящая антипролиферативная активность PB4188 в присутствии HRG в отношении клеток рака молочной железы с амплифицированным HER2**

Активность PB4188 в присутствии 10 нг/мл HRG в отношении SKBR-3 и BT-474 сравнивали с таковой у панели антител HER2, HER3 и их комбинации. Анализ проводили в матрикеле, как описано выше, и анализировали морфологические признаки. На графике с результатами АГК, представленном на фигуре 10а, видна вызванная HRG пролиферация и ветвление/инвазия клеток SKBR-3 в матрикеле. На фигуре 10b показано, что антитело PB4188 может полностью обращать вызванный HRG фенотип, тогда как комбинация исходных моноклональных антител (PG3958 + PG3178) не оказывает такого действия. Более того, PB4188 оказался гораздо более эффективным по сравнению со всеми исследованными антителами против HER3 (фигура 10c). Кроме того, комбинации отдельных антител против HER3 с трастузумабом (современный стандарт лечения при метастатическом раке молочной железы (mBC)) оказались неспособны обратить вызванный HRG фенотип (фигура 10d). Добавление трастузумаба к PB4188 в присутствии HRG

уменьшало пролиферацию и ветвление/инвазию клеток SK-BR-3 по сравнению с PB4188, применяемым отдельно (фигура 10e).

**5 Превосходящая антипролиферативная активность PB4188 в отношении клеток рака желудка с амплифицированным HER2 по сравнению с моноклональными антителами к HER2 и HER3.**

Повышенная экспрессия NRG1-β1 представляет собой ключевой механизм устойчивости к нацеленным на HER2 способам лечения (Wilson, 2012). Для того чтобы оценить, будет ли повышенная экспрессия NRG1-β1 препятствовать антипролиферативной эффективности PB4188, панель антител исследовали при концентрации HRG 100 нг/мл на линии клеток рака желудка N87 (с амплифицированным HER2). Клетки N87 культивировали в RPMI 1640, дополненной 10% термоинактивированной ФБС. Для анализа пролиферации субконфлюэнтные культуры клеток N87 промывали ФБР, трипсинизировали и инактивировали трипсин добавлением культуральной среды. Клетки промывали дважды большими объемами аналитической среды (среды RPMI 1640, содержащей 0,05% БСА и 10 мкг/мл голотрансферрина). Антитела разбавляли с получением полулогарифмических разведений с концентрациями от 1 до 0,0001 мкг/мл. Клетки добавляли при плотности 10000 клеток/лунку в присутствии 100 нг/мл конечной концентрации HRG. Клетки культивировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), следуя инструкциям производителя, и инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% в темноте. Измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм. Показали превосходящую активность PB4188 по сравнению с таковой у моноклональных антител против HER2 или против HER3 (фигура 11).

**Биспецифические антитела против HER2xHER3 вызывают АЗКЦ**

Активность АЗКЦ представляет собой важный механизм противоопухолевого действия терапевтических антител при раке. Моноклональные антитела человека, нацеленные на рецепторы семейства HER, такие как цетуксимаб и трастузумаб, вызывают АЗКЦ. Исходную и усиленную активность АЗКЦ антител PB4188 и

РВ3448 определяли в утвержденном анализе АЗКЦ *in vitro*. Трастузумаб и антитело отрицательного контроля включили в данный эксперимент в качестве контрольных антител. Из здоровых доноров получали цельную кровь и фракции МКПК. Каждое антитело исследовали на клетках-мишенях, экспрессирующих высокие уровни

5 HER2 (SK-BR-3) и низкие уровни HER2 (MCF-7). Клетки-мишени нагружали <sup>51</sup>Сг (Amersham) и опсонизировали с применением указанных концентраций антитела. Цельную кровь или фракцию МКПК использовали в качестве эффекторных клеток в реакции в объеме 200 мкл в RPMI 1640 + 10% термоинактивированной ЭТС. Клетки совместно инкубировали в течение 4 ч и оценивали лизис путем измерения

10 радиоактивности в супернатанте, применяя гамма-сцинтиллятор. Процент специфического лизиса рассчитывали, как описано далее: (экспериментальное значение имп/мин – исходное значение имп/мин)/(максимальное значение имп/мин – исходное значение имп/мин) × 100, при этом максимальный лизис определяли в присутствии 5% Triton X-100, а исходный лизис - в отсутствие антитела и

15 эффекторов. На фигуре 12 показано, что биспецифическое антитело РВ3448 проявило активность АЗКЦ, сходную с таковой у комбинации пертузумаб + трастузумаб. Биспецифическое антитело РВ4188 оказалось эффективным при высоких концентрациях антитела (10 мкг/мл).

20 **Биспецифические антитела против HER2xHER3 продемонстрировали более высокую АЗКЦ по сравнению с комбинацией исходных антител**

В отличной модели эксперимента по АЗКЦ использовали репортерный биоанализ АЗКЦ - ADCC Reporter Bioassay (Promega). В данном биоанализе использовали сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность) или F158 (низкая аффинность), и элемент

25 отклика NFAT, запускающий экспрессию люциферазы светлячка. Подтверждали правильность анализа путем сравнения результатов, полученных в репортерном биоанализе АЗКЦ, с результатами, полученными в классическом анализе высвобождения <sup>51</sup>Сг. Данные анализы АЗКЦ проводили, применяя набор ADCC

30 Bioassay от Promega, в 384-луночных планшетах с белыми лунками. В данной модели эксперимента клетки SKBR-3 высевали при плотности 1000 клеток/лунку в 30 мкл аналитической среды (RPMI с 4% сыворотки с низким содержанием IgG) за

20 – 24 ч до проведения биоанализа. На следующий день культуральную среду удаляли. Затем получали в двух повторах серийное разведение антитела PB4188 и исходных антител PG3958 против HER2 и PG3178 против HER3, а также их комбинации. В лунки добавляли по 10 мкл разведений антител. Исходная  
5 концентрация антитела составляла 10 мкг/мл, и получали 10-точечные полулогарифмические серийные разведения для построения полной кривой зависимости доза-ответ. Наконец, добавляли 5 мкл эффекторных клеток из набора ADCC Bioassay (15000 клеток/лунку, V158). Клетки инкубировали в течение 6Н при 37 °С. Затем добавляли 15 мкл субстрата для люциферазы BIO-Glo и через 5  
10 минут детектировали люминесценцию в спектрофотометре для прочтения планшетов. Полученные результаты показаны на фигуре 13. У биспецифических антител против HER2xHER3 PB4188 выявили более высокоэффективную АЗКЦ по сравнению с исходными моноклональными антителами к HER2 и HER3 или их комбинацией.

15

#### **Усиление АЗКЦ при применении PB4188**

Активность АЗКЦ можно усилить с помощью различных методик, одной из которых является удаление фукозы. Удаление фукозы приводило к повышенной противоопухолевой активности в нескольких моделях *in vivo* [Junttila, 2010]. Для  
20 максимизации активности PB4188 применяли технологию дефукозилирования (Cheng Liu и Andreia Lee. ADCC Enhancement Technologies for Next Generation Therapeutic Antibody. Antibody therapeutics -Trends in Bio/Pharmaceutical Industry 2009 [13-17]), которая позволяла предотвратить фукозилирование N-связанной углеводной структуры в Fc-области. Эффективность АЗКЦ дефукозилированного  
25 PB4188 по сравнению с таковой у PB4188 дикого типа определяли в анализе АЗКЦ с высвобождением <sup>51</sup>Сг, применяя экспрессирующие низкие уровни HER2 клетки (MCF-7) и клетки с амплифицированным HER2 (SK-BR-3). Оба антитела использовали в виде серийных разведений и включали в анализ антитело отрицательного контроля и трастузумаб. На фигуре 14 показано повышение  
30 эффективности АЗКЦ при применении дефукозилированного PB4188 по сравнению с его вариантом дикого типа и/или трастузумабом в клетках как с высокими, так и с низкими уровнями экспрессии HER2.

### **Дефукозилированное PB4188 проявило повышенную активность АЗКЦ в присутствии низкоаффинных рецепторов FcγRIIIa**

Активность дефукозилированного PB4188 исследовали на репортерных клетках АЗКЦ, содержащих либо вариант рецептора FcγRIIIa V158 (высокая аффинность), либо вариант рецептора FcγRIIIa F158 (низкая аффинность). Серийные титры антител, т.е., контрольного антитела, трастузумаба и дефукозилированного PB4188, добавляли в комбинации с репортерными клетками АЗКЦ, несущими различные варианты FcγRIIIa, к прикрепленным к субстрату клеткам SK-BR-3. Активность АЗКЦ измеряли путем измерения активности люциферазы.

Дефукозилированное PB4188 проявило активность, равную таковой у трастузумаба, в комбинации с высокоаффинным вариантом V158 рецептора FcγRIIIa. Напротив, дефукозилированное PB4188 проявило повышенную активность АЗКЦ по сравнению с таковой у трастузумаба, в комбинации с низкоаффинным вариантом F158 рецептора FcγRIIIa (фигура 15).

15

### **Исследование с ксенотрансплантатами JMT-1**

Клетки карциномы молочной железы человека JMT-1 растили в DMEM, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 100 единиц/мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 25 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамин, до момента имплантации. В день имплантации клетки молочной железы JMT-1 собирали во время логарифмической фазы роста и ресуспендировали в холодном ФБР. Возраст самок мышей CB.17 SCID (Charles River) составлял 8 недель на 1 день исследования, и масса тела была в диапазоне от 16,5 до 20,7 г. Каждой мышце вводили путем подкожной инъекции в правый бок  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток (0,2 мл суспензии клеток). Опухоли измеряли штангенциркулем в двух измерениях, чтобы отслеживать размер по среднему объему опухоли, дважды в неделю. После достижения опухолью размера приблизительно 100 - 150 мм<sup>3</sup>, животных включали в исследование эффективности. Животных с резко отклоняющимися значениями объема опухоли исключали, и мышам произвольно распределяли по группам по 10 мышей в каждой. Мышам вводили путем инъекции раз в неделю (антитело) или раз в день (лапатиниб) в

30

течение периода, составляющего четыре недели. Подробная информация о группах лечения представлена в таблице 11.

5 Размеры опухолей измеряли еженедельно с помощью штангенциркуля. В исследовании эффективности обнаружили, что PB4188 в обеих схемах введения доз было одинаково эффективным и более эффективным, чем лапатиниб или комбинация пертузумаба и трастузумаба. Результаты представлены на фигурах 17 и 18.

#### 10 **PB4188 может преодолевать опосредованную HRG устойчивость.**

Повышенная экспрессия NRG1- $\beta$ 1 представляет собой ключевой механизм устойчивости к нацеленным на HER2 способам лечения (Wilson, 2012). PB4188 исследовали по сравнению с исходным моноклональным антителом против HER3 PG3178 в серийных разведениях в присутствии возрастающих концентраций HRG (NRG1- $\beta$ 1 EGF). Для данной цели клетки N87 культивировали в RPMI 1640, дополненной 10% термоинактивированной ФБС. Для анализа пролиферации субконфлюэнтные культуры клеток N87 промывали ФБР, трипсинизировали и инактивировали трипсин добавлением культуральной среды. Клетки промывали дважды большими объемами аналитической среды (среды RPMI 1640, содержащей 0,05% БСА и 10 мкг/мл голотрансферрина). Антитела разбавляли с получением полулогарифмических разведений с концентрациями в диапазоне от 1 до 0,0001 мкг/мл. Клетки добавляли при плотности 10000 клеток/лунку в присутствии возрастающих концентраций HRG (0,04 - 39,5 нМ). Клетки культивировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), следуя инструкциям производителя, и инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% в темноте. Измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм. Показали превосходящую активность PB4188 по сравнению с таковой у исходного моноклонального антитела против HER3 (фигура 19).

25

30 Следовательно, в случае механизма ускользания, такого как, например, повышенная экспрессия NRG1- $\beta$ 1, биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению является предпочтительным.

## **Картирование эпитопов специфических к HER2/HER3 IgG**

### **Эксперименты по мутагенезу методом дробовика**

Аланин-сканирующий мутагенез применяли для картирования эпитопов PG3958 и  
5 PG3178 к HER2 и, соответственно, HER3. При мутагенезе методом дробовика  
получали клоны, в которых каждый аминокислотный остаток внеклеточного  
домена HER2/HER3 (ВКД) заменен на аланин. Затем получали ряд клеток путем  
обратной трансфекции (патент US2011/0077163A1). Для этого ДНК каждого клона  
10 смешивали с липофектаминоном и помещали полученную смесь в заранее  
определенную лунку 384-луночного планшета. Клетки HEK293T добавляли в  
каждую лунку и через 24 часа измеряли экспрессию белка. Затем измеряли  
реакционную способность антител путем иммуофлуоресцентного окрашивания,  
которое позволяло картировать связывание и идентифицировать остатки, имеющие  
15 решающее значение для связывания антитела. Уровни экспрессии конструкций  
ВКД HER2 и HER3 проверяли с помощью анализа FACS, применяя доступные для  
приобретения моноклональные антитела (MAT 1129 (HER2) от R&D и MAT 66223  
(HER3) от R&D).

### **HER2**

20 Связывание моновалентного Fab PG3958 с мутантными ВКД HER2 исследовали в  
анализе при концентрации 0,25 мкг/мл, и использовали строгие условия промывки  
(pH 9,0, 350 mM NaCl). Это позволило идентифицировать три остатка, «имеющих  
решающее значение» (T144, R166, R181), в HER2, для которых выявили менее 35%  
остаточного связывания Fab PG3958 относительно HER2 ДТ, при этом сохранялось  
25 связывание контрольного МАТ. Для двух остатков (P172, G179), которые  
расположены вблизи остатков, имеющих решающее значение, в структуре HER2  
выявили значимое, но менее выраженное снижение связывания и назвали их  
«имеющими вторичное значение» остатками (таблица 13 и фигура 21А). Все  
данные выставленные на поверхность остатки расположены в домене I HER2, и  
30 вместе они образуют прерывистый эпитоп на поверхности молекулы HER2.

### **Эксперименты для подтверждения эпитопа HER2**

Конструкции, кодирующие ВКД HER2 дикого типа (ДТ) и варианты ВКД HER2, перечисленные в таблице 13, экспрессировали в клетках CHO-K1. Три остатка домена I, которые выставлены на поверхность и в структуре находятся рядом с определенными имеющими решающее значение остатками, выбрали для  
5 дополнительного анализа. В конструкцию ВКД HER2 вводили точечные мутации T164, S180 и D143, осуществляя замену на тирозин, и полученные в результате этого конструкции также экспрессировали в CHO-K1. Вариант L159A ВКД HER2 экспрессировали в клетках CHO-K1 в качестве контрольного образца.

Исследовали связывание биспецифического антитела PG3958xTT с вариантами  
10 ВКД в эксперименте FACS с титрованием. Антитело против HER2 трастузумаб, которое связывает домен IV HER2, использовали для подтверждения экспрессии ВКД HER2 на поверхности клетки. Средние значения MFI наносили на график и для каждой кривой рассчитывали площадь под кривой, применяя программное обеспечение GraphPad Prism 5. Связывание HER2 ДТ использовали для  
15 нормировки данных. Результаты анализа FACS показали, что, дополнительно к T144A, R166A, R181A, P172A, G179A, мутации T164Y и S180Y приводили к значимому снижению связывания антитела PG3958xTT (фигура 22). Мутация D143Y приводила к резко выраженному снижению экспрессии, о чем свидетельствовало снижение связывания контрольного МАТ, следовательно, его  
20 потенциальную роль в эпитопе PG3958 невозможно определить.

### **HER3**

Анализ методом FACS связывания IgG PG3178 при концентрации 0,25 мкг/мл с мутантными ВКД HER3 привел к идентификации двух так называемых «имеющих  
25 решающее значение» остатков (F409, R426), замена которых на аланин вызывала значительное снижение связывания по сравнению с HER3 ДТ, при этом сохранялось связывание контрольного МАТ (таблица 14 и фигура 23). Оба остатка расположены в домене III HER3 и пространственно отдалены. Более того, F409 находится внутри гидрофобного ядра HER3, что делает маловероятным его участие  
30 в образовании эпитопа PG3178.

### **Эксперименты для подтверждения эпитопа HER3.**

Клетки CHO-K1 трансфицировали конструкциями с мутациями ВКД HER3 (перечисленными в таблице 14), ВКД HER3 ДТ и двумя контрольными конструкциями (H407A и Y424A). Связывание PG3178 с вариантами ВКД HER3 исследовали в эксперименте FACS с титрованием. Два контрольных антитела, связывающий домен I (MM-121) и домен III (MEND7945A) HER3 включали для подтверждения экспрессии ВКД HER3 на поверхности клетки. Средние значения MFI наносили на график и для каждой кривой рассчитывали площадь под кривой, применяя программное обеспечение GraphPad Prism 5. Связывание HER3 ДТ использовали для нормировки данных. Показали, что мутация R426A имеет решающее значение для связывания PG3178, тогда как связывание с F409A невозможно подтвердить вследствие утраты экспрессии на поверхности клетки (фигура 24).

#### **Активность PB4188 на кардиомиоцитах *in vitro*.**

HER2 участвует в росте, репарации и выживаемости кардиомиоцитов взрослых как часть сигнальной сети, которая включает комплекс рецепторов херегулина HER2:HER4. Кардиотоксичность представляет собой известный фактор риска при нацеливании на HER2, и частота осложнений повышается, когда трастузумаб применяют в сочетании с антрациклинами, тем самым вызывая сердечный стресс. Для исследования потенциальной токсичности PB4188 и сравнения его с трастузумабом и комбинацией трастузумаба и пертузумаба в присутствии антрациклина доксорубицина применяли модельную систему, основанную на полученных из стволовых клеток человека кардиомиоцитах. Полученные из стволовых клеток человека кардиомиоциты (Plurionics BV) высевали при концентрации 20000 клеток на лунку в белые аналитические планшеты с плоским дном (Corning 655098). В день 5 культивирования среду заменяли на не содержащую глюкозу и галактозу культуральную среду, дополненную 10 нг/мл HRG. В день 7 добавляли тестируемые антитела в комбинации с доксорубицином (3 мкМ). Жизнеспособность клеток оценивали в день 9, применяя анализ CellTiter-Glo от Promega. Моноспецифические антитела исследовали в одной концентрации 68 нМ, тогда как PB4188 исследовали в трех концентрациях в присутствии 3 мкМ доксорубицина. На фигуре 25 показано, что ни одна исследованная концентрация

PB4188 не влияла на жизнеспособность кардиомиоцитов. Напротив, как трастузумаб, так и комбинация трастузумаба и пертузумаба снижали жизнеспособность кардиомиоцитов.

#### 5 **Связывание PB4188 с клетками, содержащими различные уровни HER2.**

Связывание PB4188 по сравнению с таковым для трастузумаба и антитела против HER3 U1-59 анализировали с помощью FACS на линиях клеток рака молочной железы и рака желудка, экспрессирующих различные уровни HER2. Клетки считали HER2<sup>+++</sup>, если они экспрессировали миллионы копий HER2 и/или содержали амплифицированный ген HER2. Использовали следующие линии клеток: MCF-7 (HER 2 +); MDA-MB-468 (HER2 +, MKN-45 (HER2 +), MDA-MB-175 (HER2+), MDA-MB-453 (HER2 ++), MDA-MB-361(HER2 ++), ZR-75-1(HER2 ++), JMT-1 (HER2<sup>+++</sup>), BT-474 (HER2<sup>+++</sup>), SKBR-3 (HER2<sup>+++</sup>), SK-OV-3 (HER2<sup>+++</sup>), N87 (HER2<sup>+++</sup>). Клетки культуры в фазе экспоненциального роста собирали с применением трипсина и разбавляли до 10<sup>6</sup> клеток/мл в буфере для FACS (ФБР/0,5%БСА/0,5 мМ ЭДТА). 1 - 2 x10<sup>5</sup> клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета со скругленным дном лунок. Клетки центрифугировали в течение 2 минут при 300 g при 4°C. Супернатант отбрасывали путем переворачивания планшета(-ов) с последующим однократным встряхиванием.

Добавляли по 50 мкл каждого образца IgG в серийном разведении от 3,16 нг/мл до 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки однократно центрифугировали, супернатант удаляли и клетки промывали дважды буфером для FACS. Добавляли 50 мкл разведенного 1:100 антитела мыши против IgG гамма человека, конъюгированного с PE (Invitrogen), и инкубировали в течение 30 - 60 минут на льду в темноте. Клетки однократно центрифугировали, супернатант удаляли и клетки промывали дважды буфером для FACS. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto с установленным модулем HTS. Количество связанного антитела оценивали по срединному значению флуоресценции. Результаты наносили на график и определяли площадь под кривой (AUC - совокупная оценка срединного значения интенсивности флуоресценции) для каждого антитела в каждой исследованной линии клеток (фигура 2б).

На основании данного эксперимента сделали вывод, что PB4188 с более высокой аффинностью связывается с клетками HER2<sup>+++</sup>, клетками HER<sup>++</sup> и клетками HER<sup>+</sup> по сравнению с трастузумабом.

5

### **Одновременное связывание с трастузумабом**

#### **PB4188 и трастузумаб не конкурируют за связывание с HER2.**

PB4188 связывает домен I белка HER2, тогда как эпитоп связывания трастузумаба локализован в домене IV. Для того чтобы продемонстрировать, что оба антитела не конкурируют за связывание HER2, проводили анализ связывания с клетками молочной железы SKBR-3 с амплификацией HER2. Сначала немеченому антителу позволяли связаться с SKBR-3 в насыщающих концентрациях. Затем добавляли меченое FITC PB4188 в диапазоне титров и измеряли флуоресценцию с помощью FACS. На фигуре 27 продемонстрировано, что PB4188<sup>FITC</sup> связывался одинаково эффективно с клетками в присутствии трастузумаба или отрицательного контроля. Предварительная инкубация клеток SKBR-3 с PB4188 предотвращала связывание PB4188<sup>FITC</sup>. Таким образом, трастузумаб и PB4188 не конкурируют за связывание с HER2.

20

#### **Связывание домена I HER2 биспецифической молекулой против HER2xHER3 позволяет преодолеть херегулиновую резистентность.**

Для того чтобы проверить, является ли предпочтительным ориентирование PB4188 на димер HER2xHER3 для ингибирования пролиферации клеток в условиях стресса HRG, получали биспецифические антитела, состоящие из плеча HER3 и плеч HER2 3178, нацеленных на любой из доменов I, II, III или IV. Получали по два биспецифических антитела против HER2xHER3 к каждому из доменов I - IV HER2. Плечи HER2 включали: MF3958 и MF3003, нацеленные на домен I; MF2889 и MF2913, нацеленные на домен II; MF1847 и MF3001, нацеленные на домен III, и MF1849 и MF1898, нацеленные на домен IV. Каждое плечо Fab к HER2 комбинировали с плечом Fab к HER3 3178 и исследовали их эффективность в отношении ингибирования пролиферации клеток в присутствии высоких

концентраций херегулина. Титры антител тестировали на экспрессирующих низкие уровни HER2 клетках MCF-7 и экспрессирующих повышенные уровни HER2 клетках N87 и SK-BR-3. Субконфлюэнтные культуры клеток N87, SK-BR-3 и MCF-7 промывали ФБР, трипсинизировали и инактивировали трипсин  
5 добавлением культуральной среды. Клетки промывали дважды большими объемами аналитической среды (среды RPMI 1640, содержащей 0,05% БСА и 10 мкг/мл голотрансферрина). Антитела разбавляли с получением полулогарифмических разведений. Клетки добавляли при плотности 10000 клеток/лунку (N87, SK-BR-3) и 5000 клеток/лунку (MCF-7) в присутствии  
10 определенной в эксперименте вызывающей стресс концентрации HRG (10 нМ для SK-BR-3, 100 нМ для N87 и MCF-7). Клетки культивировали в течение 3 - 4 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Добавляли Alamar Blue™ (Invitrogen), чтобы оценить пролиферацию. Поглощение измеряли при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 590 нм. Во всех проведенных  
15 исследованиях только биспецифические антитела, нацеленные на домен I HER2, были способны ингибировать пролиферацию в присутствии высокой концентрации херегулина (фигура 28).

#### **Комбинации лекарственных средств с PB4188 *in vitro*.**

20 Для исследования возможности комбинирования PB4188 с низкомолекулярными лекарственными средствами, PB4188 комбинировали с лекарственными средствами, препятствующими на различных уровнях сигнальному пути PI3K или MAPK. Более того, исследовали комбинацию с химиотерапевтическими  
25 средствами и ингибиторами циклинов. Комбинации тестировали на клетках с повышенной экспрессией HER2, растущих в присутствии HRG в матригеле (SK-BR-3 и BT-474) или в присутствии концентраций HRG, вызывающих стресс (N87 и SK-BR-3, как описано в анализе пролиферации). Ингибиторный эффект комбинаций лекарственных средств исследовали путем визуализации или путем  
30 измерения уровня пролиферации с применением Alamar Blue, как описано ранее в данной заявке. Сначала определяли EC<sub>20</sub> PB4188 и исследуемых лекарственных средств. Затем проводили титрование в шахматном порядке PB4188 и лекарственных средств. Во всех исследованных линиях клеток наблюдали

синергию с ингибиторами тирозинкиназ (афатинибом, лапатинибом, нератинибом), ингибитором PI3Ka BYL719, ингибитором Akt MK-2206, ингибитором mTOR эверолимусом, ингибитором Src саракатинибом, разрушающим микротрубочки лекарственным средством паклитакселом и  
5 ингибитором HDAC вориностатом (который написан с ошибкой на фигуре 40 как «воронистат»). На фигуре 29 показан пример синергической комбинации PB4188 с лапатинибом на клетках SKBR-3, которые растили в матригеле, которая привела к морфологическим изменениям и снижению роста клеток. Рассчитывали степень ингибирования роста, полученную для каждой комбинации. Сдвиг эффективности  
10 можно показать с помощью изоболограмм (Gresco и др. 1995), на которых показано, насколько меньшее количество лекарственного средства потребуется в комбинации для достижения желательного уровня по сравнению с количеством отдельного агента, необходимым для достижения данного эффекта. Значения ингибирования, полученные в экспериментах с комбинированием, использовали в  
15 программном обеспечении Analyzer от CHALICE™ для получения изоболограмм. Изоболограммы различных комбинаций лекарственных средств, исследованных на клетках с амплифицированным HER2, представлены на фигуре 40. Анализ изоболограмм показал, что PB4188 проявило синергическое действие в комбинации с лекарственным средством афатинибом, лапатинибом, нератинибом,  
20 BYL719, MK-2206, эверолимусом, саракатинибом, вориностатом и паклитакселом. Данные результаты демонстрируют, что лекарственные средства, воздействующие на путь PI3K, особенно эффективны в комбинации с PB4188. Кроме того, эффективны комбинации с ингибиторами тирозинкиназ. Более того, комбинация с лекарственным средством, препятствующим росту и миграции/инвазии,  
25 саракатинибом может оказаться предпочтительной в условиях метастазирования.

### **Ингибирование фосфорилирования *in vitro* антителом PB4188**

Собирали клетки из культуры в экспоненциальной фазе роста и высевали в 6-луночные планшеты ( $3,75 \times 10^6$  клеток для N87 и  $1,5 \times 10^6$  клеток для SKBR-3) в  
30 среду для голодания клеток (клетки N87: RPMI-1640, 0,05% БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина; клетки SKBR-3: DMEM/F-12, 2 mM L-глутамин, 0,05% БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина) и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при

относительной влажности 95%. На следующий день, добавляли антитела до конечной концентрации 5 нМ и инкубировали клетки в течение одного часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. Затем добавляли HRG до конечной концентрации 100 нг/мл. Через 1, 3, 6 или 24 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95% планшеты помещали на лед, клетки промывали 5 дважды холодным ФБР. Затем добавляли 0,3 мл ледяного лизирующего буфера (Cell signaling RTK № 9803 или IC № 7018) и клетки лизировали в течение минимум 30 минут на льду. Далее измеряли концентрации белков, применяя ВСА (Pierce №23235). Концентрации белка доводили до 2 мг/мл с помощью лизирующего 10 буфера. Затем лизаты тестировали в анализах PathScan RTK Signaling Antibody Array (Cell signaling №7949) или PathScan Intracellular Signaling Array. Все этапы инкубации проводили с запечатанными лунками на орбитальном шейкере при комнатной температуре. Лизаты (75 мкл) разбавляли в 2 раза до концентрации 0,8 мг/мл 75 мкл буфера для разбавления Array Diluent Buffer, дополненного коктейлем 15 ингибиторов протеаз, и держали на льду. Лунки для тестирования блокировали 100 мкл блокирующего буфера Array Block Buffer в течение 15 минут. Блокирующий буфер удаляли, лизаты помещали в лунки и оставляли инкубироваться в течение 2 часов. Лизат аспирировали и лунки промывали 4 раза 100 мкл буфера для промывки. Затем добавляли по 100 мкл коктейля детектирующих антител в каждую 20 лунку и инкубировали в течение 1 часа. Коктейль антител аспирировали и лунки промывали 4 раза 100 мкл буфера для промывки. В каждую лунку добавляли 75 мкл стрептавидина Dylight80™. Стрептавидин Dylight80™ аспирировали и лунки промывали 4 раза 100 мкл буфера для промывки. Многолуночный уплотнитель удаляли и предметные стекла промывали в течение 10 секунд 10 мл 25 деионизированной воды. Предметным стеклам позволяли высохнуть и обрабатывали для визуализации на Odysee®Clx. Интенсивность флуоресценции пятен рассчитывали, применяя программное обеспечение Image Studio.

В клетках N87 и SKBR-3 PB4188 полностью блокировало фосфорилирование Akt 30 в течение первых 6 ч инкубации, в противоположность комбинации трастузумаб + пертузумаб. Вдобавок, наблюдали сильное ингибирование фосфорилирования

ERK и S6 в противоположность комбинации трастузумаб + пертузумаб. PB4188 не ингибировало фосфорилирование HER2 (фигура 30)

#### **Анализы методом вестерн-блот**

- 5 Для подтверждения ингибирования фосфорилирования, наблюдаемого в тестах RTK и внутриклеточного Pathscan, проводили анализы методом вестерн-блот клеток, обработанных PB4188, комбинацией пертузумаба и трастузумаба и контрольным антителом в присутствии вызывающих стресс концентраций HRG. Собирали клетки культуры в экспоненциальной фазе роста и высевали в чашки
- 10 диаметром 10 см ( $20 \times 10^6$  клеток для N87 и  $7 \times 10^6$  клеток для SKBR-3) в среду для голодания клеток (клетки N87: RPMI-1640, 0,05% БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина; клетки SKBR-3: DMEM/F-12, 2 mM L-глутамин, 0,05% БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина). На следующий день добавляли антитела до конечной
- 15 концентрации 5 нМ и инкубировали клетки в течение одного часа. Затем добавляли HRG до конечной концентрации 100 нг/мл. Через 1, 3, 6 или 24 часа чашки помещали на лед, клетки промывали дважды холодным ФБР, переносили в пробирки Eppendorf и лизировали с помощью 250 мкл лизирующего буфера RIPA (20 mM Трис-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1 mM этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА), 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия,
- 20 0,1% ДСН, 2,5 mM пиродифосфат натрия, 1 mM бета-глицерофосфат, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мкг/мл леупептина). Лизису позволяли продолжаться в течение 30 минут на льду. Лизаты клеток центрифугировали и собирали супернатанты в новые пробирки Eppendorf. Концентрацию белка определяли, применяя способ BCA (Pierce). 30 мкг лизата разделяли на 4 - 12 % геле Bis-Tris NuPage (Invitrogen) и белки переносили
- 25 с геля на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны блокировали в течение одного часа в буфере ТБСТ, содержащем 5 % БСА, и окрашивали указанными антителами согласно инструкциям производителя (Cell Signaling Technology). Мембраны затем инкубировали с конъюгированным с HRP вторичным антителом, инкубировали с субстратом ЭХЛ (ECL) и подвергали автордиографии, используя рентгеновские
- 30 пленки (Amersham). Все детектирующие антитела получали от Cell Signaling Technology: Phospho-Akt (ser 473) №4060, Total Akt №4691, Phospho-HER2 (Tyr 1221/1222) №2243, Total HER2 №2242, Phospho-HER3 (Tyr 1289) №4791, Total

HER3 №4754, Phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) №4377, Total ERK1/2 №4695, Phospho-S6 RP (Ser 235/236) №2211, Total S6 RP №2217, антитело козы против антител кролика, конъюгированное с HRP, №7074.

Полученные результаты показали, что РВ4188 вызывал длительное ингибирование фосфорилирования HER3, приводящее к ингибированию обоих сигнальных путей MAPK и PI3-киназы с выраженным эффектом ингибирования фосфорилирования Akt (фигура 31).

## 10 **Фармакодинамика РВ4188 *in vivo***

### **Анализ фосфопротеинов с помощью Luminex.**

Опухоли (100 мм<sup>3</sup>) мышей, которым трансплантировали JIMT-1 и которых лечили 2 дозами РВ4188 и 4 дозами РВ4188, удаляли через 24 ч после введения доз. Опухоли подвергали быстрой заморозке и перерабатывали с получением порошка. Лизаты опухоли получали в концентрации 50 мг опухоли/мл, добавляя холодный лизирующий буфер BioRad (дополненный 0,4% фактора 1 BioRad, 0,2% фактора 2 BioRad и 2 мМ фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ)) к замороженному порошку образцов, инкубировали при 4°C на качалке в течение 60 минут, чтобы гарантировать полный лизис. Образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 минут при 16000 x g и разделяли на аликвоты. Общее количество белка определяли, применяя реагенты Biorad DC Protein Assay, в соответствии с инструкциями производителя. Анализ Luminex. Образцы лизата опухоли JIMT-1 обрабатывали и анализировали присутствие в них: общего АКТ, АКТ(Ser473) и АКТ(Thr308), применяя коммерчески доступные наборы Luminex от Millipore (№ в каталоге 48-618MAG (№ партии 2532050), 46-645MAG (№ партии 46645M-1K)). Каждый образец исследовали в двух повторах. Готовили разведения в разбавителе для образцов, чтобы загрузить приблизительно 25 мкг целевого белка на лунку, для определения всех общих и фосфорилированных анализируемых веществ. Наборы Millipore использовали в соответствии с инструкциями производителя.

В опухолях, которые лечили РВ4188, выявили повышенную экспрессию Akt по сравнению с не подвергнутыми лечению опухолями. РВ4188 полностью ингибировало фосфорилирование АКТ как после применения двух доз в неделю, так и после применения четырех доз в неделю (фигура 32).

5

#### **Анализ фосфопротеинов с помощью метода VeraTag.**

Опухоли (100 мм<sup>3</sup> или 400 мм<sup>3</sup>) мышей, которым трансплантировали JIMT-1 и которых лечили 1 или 2 дозами РВ4188, удаляли и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. Мышей, несущих опухоли объемом 100 мм<sup>3</sup>, умерщвляли через 24 ч после разовой дозы РВ4188 (25 мг/кг), тогда как мыши, несущие опухоли объемом 400 мм<sup>3</sup>, получили 2 дозы в неделю в размере 25 мг/кг, и их умерщвляли через 4 ч после введения доз. Затем образцы заключали в парафин. Делали срезы толщиной по 7 мкм с помощью микротомы (LEICA) и помещали их на положительно заряженные предметные стекла (VWR), подписанные серийными номерами. Предметные стекла сушили на воздухе в течение 30 мин, а затем прогревали в нагретой до 60°C печи. Далее образцы обрабатывали для проведения различных анализов VeraTag. Анализ общего HER2 (НТ2) проводили согласно заявке на патент США № 12/340436, анализ общего HER3 (НЗТ) проводили согласно патенту США № 8349574; заявке на патент США № 2013/0071859, и, наконец, анализ гетеродимера HER2-HER3 (Н23D), HER3pY1289 (НЗpY1289) и киназы HER3-PI3 (НЗPI3К) проводили согласно заявке на Международный патент № PCT/US2014/033208. В обеих схемах введения доз было очевидно значимое опосредованное РВ4188 уменьшение количества димеров HER2:HER3 по сравнению с не подвергнутыми лечению контролями. Не наблюдали различия в количестве общего HER2, HER3 или фосфорилированного HER3 между опухолями, которые лечили РВ4188, и контролями. Для опухолей, которые анализировали через 4 ч после введения дозы РВ4188, продемонстрировали значимое уменьшение количества HER3-p85 (PI3К) по сравнению с не подвергнутыми лечению контролями.

30

**PB4188 подавляло продвижение по клеточному циклу стимулированных HRG раковых клеток**

Способность PB4188 влиять на продвижение по клеточному циклу исследовали на линиях раковых клеток, экспрессирующих различные уровни белка HER2. HER2+ (MCF-7), HER2+++ (клетки JIMT-1, SK-BR-3 и N87) клетки высевали в аналитическую среду (клетки MCF-7: RPMI-1640, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина, 1 мМ пирувата натрия, раствор заменимых аминокислот MEM NEAA; JIMT-1: DMEM, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина; клетки SK-BR-3: DMEM/F-12, 2 мМ L-глутамин, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина; клетки N87: RPMI-1640, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина). В каждую лунку 24-луночного планшета высевали 300000 клеток MCF-7, или 400000 клеток N87, или 150000 клеток SK-BR-3, или 150000 клеток JIMT-1 в 1 мл аналитической среды и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. На следующий день к клеткам добавляли PB4188, или пертузумаб + трастузумаб, или PG3178, или PG1337 в присутствии конечной концентрации HRG 1 или 100 нг/мл. Через 24 часа (для клеток JIMT-1, N87 или SK-BR-3) или 48 часов (для клеток MCF-7) инкубации при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%, к клеткам добавляли 5-этинил-2'-дезоксисуридин (EdU, конечная концентрация 10 мкМ) на 2 часа, а затем собирали клетки и окрашивали для оценки встраивания EdU, применяя набор Click-iT EdU AlexaFluor488, следуя инструкциям производителя (LifeTechnologies, № в каталоге C10425). По меньшей мере за 30 мин до анализа клеток с помощью проточной цитометрии на FACSCanto, клетки инкубировали с 200 нМ красителя FxCycle, излучающего в дальней инфракрасной области спектра (LifeTechnologies, № в каталоге F10348), и 100 мкг/мл РНКазы А (LifeTechnologies, № в каталоге 12091-039). Регистрировали события в канале AlexFluor488 (для детектирования EdU) и в канале APC (для детектирования окрашивания общей ДНК красителем FxCycle). Результаты анализировали путем установки дискриминационного окна на отдельные клетки на диаграмме рассеяния с отображением FSC по ширине и FSC по высоте, и установки внутри него дискриминационных окон для фаз клеточного цикла G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>M на диаграмме рассеяния APC против AlexFluor488 с получением популяций EdU<sup>neg</sup>APC<sup>low</sup>, EdU<sup>pos</sup> и EdU<sup>neg</sup>APC<sup>high</sup>, соответственно.

Данные представлены в виде коэффициента пролиферации, рассчитанного путем деления процента клеток в фазах S и G2/M на процент клеток в фазе G0/G1. На фигуре 34 показано, что PB4188 стабильно более эффективно, чем PG3178 или пертузумаб + трастузумаб, ингибирует пролиферацию, вызванную стандартной (1 нг/мл) или высокой (100 нг/мл) концентрацией HRG. При высоких концентрациях HRG PB4188 все еще ингибирует продвижение по клеточному циклу.

### **PB4188 вызывает интернализацию рецептора**

Характер интернализации антител измеряли, применяя чувствительные к pH красители. Этот способ был описан в данной области в WO2013134686 A1, где такие красители, когда они связаны с антителом, проявляют повышенный сигнал флуоресценции, если их подвергнуть более низкому pH. Это происходит, когда связанные с красителем антитела интернализуются с поверхности клеток-мишеней в слабокислые эндосомы (pH 6 - 6,5), а затем в кислые лизосомы (pH ниже 5,5). Для того чтобы исследовать, происходит ли интернализация PB4188 в раковых клетках, антитело соединяли с pH-чувствительным красителем с реакционно-способной группой сукцинимидилового эфира (Promega, № в каталоге CS1783A01), следуя инструкциям производителя. Для сравнения в анализ включали меченые красителем антитела против HER2 (трастузумаб, пертузумаб, PG3958), против HER3 (PG3178, №Ab6) и антитело отрицательного контроля (против столбнячного токсина, PG1337).

Собирали культуры раковых клеток SKBR-3 и N87 с повышенной экспрессией HER2 в экспоненциальной фазе роста и высевали на 96-луночные планшеты (15x10<sup>3</sup> клеток на лунку) в 100 мкл аналитической среды (клетки N87: RPMI-1640, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина; клетки SKBR-3: DMEM/F-12, 2 mM L-глутамин, 0,05 % БСА, 10 мкг/мл голотрансферрина), содержащей 1 нг/мл HRG, и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. На следующий день добавляли 20 мкл меченых чувствительным к pH красителем антител до достижения конечной концентрации 100 нМ и инкубировали клетки в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, при относительной влажности 95%. На следующий день клетки собирали путем сбора не прикрепленных к субстрату клеток и трипсинизирования прикрепленных к

субстрату клеток. После промывки клеток буфером для FACS (ФБР, 0,5% БСА, 0,1% азид натрия) клетки окрашивали меченым APC антителом к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, № в каталоге 109-136-098, разведение 1:100). Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto (BD Biosciences),  
5 измеряя срединные значения интенсивности флуоресценции (MFI) в каналах PE и APC, чтобы определить интернализацию и остаточное связывание антител с поверхностью, соответственно. Результаты, представленные на фигуре 35, показывают, что PB4188 интернализуется в такой же степени, как и трастузумаб, в то время как комбинация трастузумаб + пертузумаб приводит к повышенной  
10 интернализации. Комбинация трастузумаб + пертузумаб снижает АЗКЦ по сравнению с трастузумабом отдельно (фигура 36). Следовательно, ожидают, что уровень интернализации PB4188 оставит эффективность АЗКЦ неизменной.

### **Получение и определение характеристик вариантов антитела против HER3** 15 **3178**

Были разработаны варианты антитела против HER3 MF3178 с целью улучшить свойства антитела. Мутации вводили в ген VH в каркасную область 1 (FR1), определяющую комплементарность область 1 (CDR1), FR2, CDR2 и/или FR3, при этом CDR3 и FR4 оставляли без модификации. Разработка включала, но не была  
20 ограничена мутациями, которые вводили, чтобы удалить мотивы посттрансляционной модификации (PTM) (например, путем замены мотива дезаминирования NS на NQ), чтобы снизить гидрофобность поверхности (например, путем замены I на T), или чтобы повысить изоэлектрическую точку (pI; например, путем замены Q на K). Все 20 вариантов (см. фигуру 37)  
25 экспрессировали в виде биспецифического антитела с комбинации с плечом против столбнячного токсоида (ТТ) и исследовали в функциональном анализе MCF-7, и у всех 20 вариантов выявили эффективность, сходную с таковой у антитела MF3178 в данном формате. Все 20 вариантов также исследовали в данном формате в анализе FACS связывания различных титров вариантов с MCF-7, и у всех вариантов  
30 оказались очень близкие профили связывания, позволяя предложить, что аффинности всех вариантов сходны. Для дополнительных экспериментов выбрали три лучших варианта MF6058, MF6061 и MF6065, которые содержали мутации

десяти, трех и семи аминокислот, соответственно (см. последовательности на фигуре 16E и фигуре 37). Соответствующее моноспецифическое IgG1 PG6058, PG6061 и PG6065 получали и очищали в крупном масштабе. На фигуре 38 показано, что ингибиторная активность данных трех вариантов в анализе пролиферации зависимой от HRG линии клеток N87 сходна с таковой у PG3178. Профиль КО-ВЭЖХ указанных трех вариантов был сходен с таковым у PG3178 в отношении гетерогенности заряда, а также ширины и симметричности пика, как показано на фигуре 39. Время удерживания (tR) основного пика приблизительно коррелировало с pI антител, т.е., более высокое значение pI приводило к более длительному времени удерживания. При разработке биспецифических антител или смесей антител, выбор вариантов антител с оптимальным tR важен, поскольку можно облегчить очистку желательных компонентов антител, применяя катионообменную хроматографию.

## 15 **Пример 2**

Определяли эффективность биспецифического антитела MCLA-128, направленного против HER2 и HER3, у мышей с внутрочерепными опухолями из полученных из пациента ксенотрансплантатов (PDX). Эффективность MCLA-128 сравнивали с T-DM1. Кроме того, комбинацию MCLA-128 и T-DM1 сравнивали с лечением отдельными агентами.

### **Животные**

Исследование проводили на 43 (включая 11 запасных животных) самках голых мышей NMRI (заказаны животные одинакового возраста с точностью до одной недели, в возрасте приблизительно 6 недель) из питомника Janvier Labs, Франция.

### **Размещение и обращение с животными**

30 *Контроль за состоянием здоровья.*

Мышам проводили клинический осмотр при поступлении на Кафедру экспериментальной медицины, строение 10.3, Университет Копенгагена, в

соответствии со Стандартными процедурами животноводческого комплекса. Обученный персонал обращался с мышами под ветеринарным надзором. Все животные были здоровы, и не было сделано замечаний к условиям их содержания.

5 *Акклиматизация.*

Перед началом экспериментальных процедур мышам давали возможность акклиматизироваться в течение 14 дней.

*Размещение и окружающая среда.*

- 10 Животных поселяли в комнате/лаборатории для животных. Комната освещалась с соблюдением цикла 12 часов света и 12 часов темноты. Свет включали с 06:00 ч до 18:00 ч. Мышей поселяли в индивидуально вентилируемые клетки (ИВК, ИВС) типа III, Techniplast (820 см<sup>2</sup>, высота 15,5 см, максимум 8/минимум 2 мыши на клетку). За животными ежедневно присматривали лаборанты, тогда как ветеринары
- 15 осматривали животных в лаборатории раз в два месяца или по запросу лаборантов. Каждая клетка была подписана с указанием по меньшей мере идентификационного номера исследования, группы и количества животных и тестируемого соединения. Клетки оборудовали одноразовой пластиковой вставкой после внутрочерепной имплантации опухоли.

20

*Подстилка.*

В качестве подстилки использовали древесину осины от Brogårdén/Finn Tarvei Oy, FIN-73620 Корттейнен, Финляндия. Подстилку заменяли раз в две недели.

25 *Улучшение окружающей среды.*

- Животным предлагали запас материала для гнездования, Brogårdén, при каждой замене подстилки. Более того, в каждой клетке находились деревянные палочки от Brogårdén/Finn Tarvei Oy, FIN-73620 Корттейнен, Финляндия, и изготовленное на
- 30 заказ прозрачное красное пластиковое укрытие.

*Диета и питьевая вода.*

Гранулированный полноценный корм «Altromin 1319», сбалансированная диета для крыс и мышей, был доступен без ограничения, и его заменяли каждые 14 дней. У животных был свободный доступ к водопроводной воде, которую заменяли еженедельно. В питьевую воду добавляли эстроген после внутрочерепной имплантации опухоли.

#### **Гуманные конечные точки.**

Животных умерщвляли из соображений гуманности. Гуманные причины умерщвления животного включали, но не ограничены перечисленными: случаи, когда у животных обнаруживали признаки постоянного страдания, боли или страха. Особые гуманные конечные точки для данного исследования обусловлены системой балльной оценки, представленной в таблице 16. При соответствующих показаниях мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков.

15

#### **Методы.**

Временная шкала для исследования, представленного в таблице 17.

#### *20 Внутрочерепная имплантация опухоли*

Собирали подкожную опухоль ST1360B PDX (4<sup>ый</sup> пассаж), выращенную в голой мышце NMRI, кривую роста опухоли см. на фигуре 41. Мышам, несущим опухоли ST1360B, дополнительно давали эстроген после имплантации опухоли. Опухоль промывали ФБР и отсекали с поверхности остаточное количество соединительной ткани. Опухоль иссекали на маленькие кусочки и расщепляли аккутазой и коллагеназой IV с получением суспензии отдельных клеток. Расщепление останавливали добавлением среды, содержащей фетальную бычью сыворотку, и суспензию клеток фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 мкм, промывали ФБР и ресуспендировали в ФБР. Жизнеспособность опухолевых клеток проверяли путем окрашивания трипановым синим, и конечная концентрация составляла 18 миллионов жизнеспособных клеток/мл. Жизнеспособность всех клеток составляла более 80%. Не разделяли клетки на стромальные или опухолевые, и растворы также

30

содержали некоторое количество обломков клеток. Для ST1360B продемонстрировали высокую насыщенность опухоли клетками. Клетки держали на льду до момента инокуляции.

5 Мыши получали в качестве анестезии гипнорм/мидазолам (1 мл/100 г массы тела) и помещали в стереотаксическую рамку для фиксации головы. Делали продольный разрез на коже черепа, чтобы обнажить *calvarium*. В черепе сверлили отверстие на 1,5 мм справа от *sutura saggitalis* и на 0,5 мм позади от *bregma*, применяя микродрель. Десять мкл суспензии клеток (180000 клеток) вводили путем  
10 инъекции на глубину 2 – 2,5 мм при скорости потока 60 нл/сек, применяя шприц емкостью 100 мкл с иглой 25 калибра, помещенный в микроинфузионный насос. Иглу оставляли на 3 минуты перед извлечением. Бупивакаин (0,2 мг/100 г массы тела) и лидокаин (1 мг/100 г массы тела) вводили в место разреза для местной анестезии и кожу соединяли с помощью шва. Мышам прокалывали ухо, вставляли  
15 идентификатор и возвращали в клетки, где за ними наблюдали до тех пор, пока они полностью не оправлялись от анестезии. Мышей проверяли по меньшей мере дважды в неделю (масса тела и клинические признаки) после инокуляции опухоли или чаще, если присутствовали клинические признаки или потеря масса тела.

20 *Магнитно-резонансная томография (МР-визуализация).*

Развитие опухоли отслеживали раз в две недели с помощью T2-взвешенной МР-визуализации (аксиальная и фронтальная проекции). Первую процедуру визуализации проводили через 19 дней после инокуляции опухоли. Животные получали анестезию во время процедур МР-визуализации (севофлуран, 2 - 4% в  
25 окружающем воздухе, дополненном 100% O<sub>2</sub> при соотношении приблизительно 4:1).

Включали в исследование на основании двух патологических изображений МР-визуализации, на которых был зарегистрирован рост опухоли и объем опухоли, приблизительно равный 10 - 20 мм<sup>3</sup>. Мышей, которые удовлетворяли критериям  
30 включения в исследование, случайным образом распределяли в одну из четырех групп. В исследование включали первых 32 мышей, которые удовлетворяли критериям включения. Мышей случайным образом распределяли по группам

таким образом, что во всех группах был одинаковый средний объем опухоли на момент начала лечения.

#### *Терапия*

- 5 Мышам вводили дозу любого из перечисленных агентов: среды, MCLA-128, T-DM1 или MCLA-128 + T-DM1, согласно таблице 18. Лекарственные средства разбавляли в стерильном солевом растворе перед каждым введением дозы. Мышей помещали под нагревательную лампу приблизительно на 5 - 10 минут перед инъекцией тестируемого соединения, чтобы сделать эту процедуру как можно
- 10 более быстрой. Мышь помещали в фиксатор для хвостовой инъекции и вводили дозу тестируемого соединения в боковую хвостовую вену в виде однократной внутривенной (в/в) болюсной дозы. Объем дозы составлял 5,0 мл/кг.

#### *МР-визуализация и контроль массы тела после терапии.*

- 15 Развитие опухоли отслеживали раз в две недели с помощью T2-взвешенной МР-визуализации (аксиальная и фронтальная проекции) в течение первых двух недель после начала терапии и еженедельно до 6 недель после терапии. Животные получали анестезию во время процедур МР-визуализации (севофлуран, 2 - 4% в
- 20 4:1).

Животных умерщвляли путем смещения шейных позвонков по индивидуальным показаниям в соответствии с гуманными конечными точками, таблица 16. Головной мозг с опухолью иссекали и сохраняли в 4% формальдегиде в течение 24

25 - 48 часов и переносили в 70% этанол. Соотношение фиксатор:ткань составляло по меньшей мере 20:1.

#### *Анализ изображений.*

- Объемы опухолей измеряли на изображениях путем обводки областей интереса
- 30 (ОИ) на отдельных срезах и вычисления объема ОИ. ОИ обводили как на аксиальном, так и на фронтальном срезах, и средний объем опухоли в двух проекциях использовали в качестве объема опухоли. Отек в головном мозге

оценивали вручную, присваивая балы по шкале от 0 до 4, где балл 0 соответствовал отсутствию отека головного мозга, а балл 4 свидетельствовал о массивном отеке головного мозга, см. фигуру 42. Анализ изображений проводили, применяя Horos (Horos Project (2017). DICOM image viewing and measuring. [Horos]. <http://www.horosproject.org/>).

## Результаты

### *Включение в исследование и случайное распределение по группам.*

10 Первых животных включили в исследование через 23 дня после внутрочерепной имплантации опухоли. Даты включения и объем опухоли при включении в исследование для всех животных приведены в таблице 19. Массы тела и объемы опухолей мышей в группах А - D в момент включения в исследование показаны на фигуре 43. Не наблюдали различия в массе тела или объеме опухоли между группами (однофакторный дисперсионный анализ,  $p = 0,43$  (масса тела) и  $p = 0,92$  (объем опухоли)). Фигура 43: масса тела и объем опухоли в момент включения мышей в группу А - D. Не наблюдали различия в массе тела или объеме опухоли между группами (однофакторный дисперсионный анализ,  $p = 0,43$  (масса тела) и  $p = 0,92$  (объем опухоли)).

20

### *Контроль после терапии.*

T2-взвешенные МРТ проводили в день 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35 и 42 после начала терапии для измерения внутрочерепного объема опухоли. Средний объем опухоли после начала терапии для каждой группы изображен на фигуре 44. 25 Индивидуальные объемы опухолей для животных в каждой группе показаны на фигурах 46 - 49. Примеры T2-взвешенных изображений мышей показаны на фигурах 50 - 53. Рост опухоли был ингибирован в мышцах, которых лечили T-DM1 и T-DM1 + MCLA-128, тогда как наблюдали замедление роста опухоли у мышей, которых лечили MCLA-128, по сравнению с мышцами, которым вводили среду. 30 Наблюдали значимое различие в объеме опухоли через 10 дней после терапии ( $p = 0,009$ , однофакторный дисперсионный анализ), и средний объем опухоли мышей, которых лечили T-DM1 и T-DM1 + MCLA-128, был значительно меньше, чем

таковой у мышей, которым вводили среду ( $p < 0,05$ , с поправкой на множественные сравнения; критерий Тьюки).

5 За массой тела мышей внимательно следили после начала терапии. Средняя масса тела мышей в различных группах показана на фигуре 45. Измеренные массы тела для каждой мыши в различных группах показаны на фигурах 54 - 57 как в граммах, так и в виде процентного изменения относительно массы тела в момент включения в исследование. По результатам индивидуальных измерений массы тела очевидно, что большинство мышей теряли массу тела до достижения гуманных конечных  
10 точек.

#### *Балльная оценка отека головного мозга*

Стаз опухоли (присутствие опухоли, которая не растет) наблюдали у животных в группах В и D. Оценка изображений МРТ, наиболее близких к моменту  
15 умерщвления, показала, что у некоторых животных присутствовал отек головного мозга. Это могло способствовать ухудшению состояния мышей и необходимости умерщвления. Проводили балльную оценку отека в головном мозге вручную по шкале от 0 до 4: 0 указывал на отсутствие отека головного мозга, а 4 указывало на массивный отек головного мозга (таблица 20 и фигура 58). Наблюдалась  
20 склонность к большему отеку в группах, которые лечили T-DM1 (группы В и D). Тем не менее, не было значимого различия в отеке головного мозга между группами (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса). Интерпретировать данные результаты следует с осторожностью, так как балльную оценку отека проводили не в один и тот же момент времени и не во время умерщвления. Также  
25 объемы опухолей различались между группами, что также могло влиять на отек головного мозга. Следовательно, данное исследование не было разработано для подробного изучения влияния лечения на отек головного мозга.

#### *Анализ выживаемости.*

30 Мышей умерщвляли вследствие достижения гуманных конечных точек согласно таблице 16. Несмотря на тщательный контроль, четыре мыши были обнаружены мертвыми в клетках во время исследования. Из животных, которые были

обнаружены мертвыми в клетке, не сохраняли материал опухоли *ex vivo*. Кривые результатов выживаемости Каплана-Мейера для всех групп представлены на фигуре 59. Кривые выживаемости значительно различались ( $p < 0,0001$ , логарифмический ранговый критерий). Срединное значение выживаемости животных, которых лечили средой, T-DM1, MCLA-128 и T-DM1 + MCLA-128, составляло 13, 19,5, 29 и 42 дня после начала терапии, соответственно. Попарное сравнение кривых Каплана-Мейера представлено на фигуре 60. Значимо (логарифмический ранговый критерий) большее срединное значение выживаемости наблюдали для лечения T-DM1 по сравнению со средой (19,5 по сравнению с 13 днями,  $p = 0,020$ ), MCLA-128 по сравнению со средой (29 по сравнению с 13 днями,  $p < 0,0001$ ) и T-DM1+MCLA-128 по сравнению со средой (42 по сравнению с 13 днями,  $p < 0,0001$ ). Не наблюдали различия в срединном значении выживаемости для лечения MCLA-128 по сравнению с T-DM1 (29 по сравнению с 19,5 днями,  $p = 0,10$ , логарифмический ранговый критерий). У мышей, которых лечили T-DM1 + MCLA-128, наблюдали значимо (логарифмический ранговый критерий) большее срединное значение выживаемости по сравнению с мышами, которых лечили T-DM1 (42 по сравнению с 19,5 днями,  $p = 0,0005$ ) или MCLA-128 (42 по сравнению с 29 днями,  $p = 0,013$ ).

## 20 Обсуждение

T-DM1 и T-DM1 + MCLA-128 ингибировали рост опухоли, тогда как MCLA-128 приводил у замедлению роста опухоли, что определили по T2-взвешенному МРТ. Срединное значение выживаемости мышей, которых лечили средой, T-DM1, MCLA-128 и T-DM1 + MCLA-128, составляло 13, 19,5, 29 и 42 дня после начала терапии, соответственно. У мышей, которых лечили MCLA-128, наблюдали значимо большую выживаемость по сравнению с животными, которым вводили среду (29 по сравнению с 13 днями,  $p < 0,0001$ ), и у мышей, которых лечили T-DM1 + MCLA-128, наблюдали значимо большее срединное значение выживаемости по сравнению с мышами, которых лечили T-DM1 (42 по сравнению с 19,5 днями,  $p = 0,0005$ ) или MCLA-128 (42 по сравнению с 29 днями,  $p = 0,013$ ). Наблюдали склонность к повышенному отеку в группах, которые лечили T-DM1 (группы В и

D). Тем не менее, не было обнаружено значимого различия в отеке головного мозга между группами (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса). В заключение, MCLA-128 проявил эффективность в отношении выживаемости мышей с внутричерепными опухолями ST1360BPDХ как в виде монотерапии, так и в комбинации с T-DM1.

**Пример 3. II фаза испытания комбинаций на основе MCLA-128 при метастатическом раке молочной железы (МРМЖ): MCLA-128/трастузумаб/химиотерапия в HER2-положительном МРМЖ.**

10

Хотя в данном примере описано введение MCLA-128/трастузумаба/химиотерапии, не предполагается, что данный пример ограничен применением набора данных конкретных терапевтических агентов, и он распространяется на описанные связывающие ErbB-2 и ErbB-3 биспецифические антитела в комбинации со связывающим ErbB-2 агентом, включая ингибиторный агент, и химиотерапией.

15

**ЦЕЛИ**

**HER2-положительный/амплифицированный МРМЖ: MCLA-128 + трастузумаб ± винорелбин**

20

Первичная цель:

- Оценить эффективность MCLA-128 в комбинации трастузумабом ± винорелбин в отношении уровня клинической пользы (УКЭ) через 24 недели на основании критерия RECIST 1.1 (по усмотрению исследователя) у пациентов с HER2-положительным/амплифицированным МРМЖ, у которых наблюдалось прогрессирование на предшествующей направленной против HER2 терапии, которая включала трастузумаб с пертузумабом, и конъюгат антитела против HER2 с лекарственным средством (АЛК).

25

30

Вторичные цели:

- Оценить УКЭ через 24 недели на основании RECIST 1.1 согласно централизованной проверке
- 5 • Оценить выживаемость без прогрессирования (ВБП; по усмотрению исследователя и централизованной проверки)
- Оценить частоту общего ответа (ЧОО) на основании RECIST 1.1 (по усмотрению исследователя и централизованной проверки).
- Оценить продолжительность ответа (ПрО) на основании RECIST версии 1.1 (по
- 10 усмотрению исследователя и централизованной проверки)
- Оценить общую выживаемость (ОВ)
- Оценить безопасность и переносимость MCLA-128 в комбинации с трастузумабом ± винорелбин
- Охарактеризовать фармакокинетику (ФК) MCLA-128 в комбинации с
- 15 трастузумабом ± винорелбин
- Охарактеризовать иммуногенность MCLA-128 в комбинации с трастузумабом

Поисковая цель:

- Оценить потенциальные взаимосвязи между биомаркерами в образцах опухоли
- 20 или крови и противоопухолевой активностью (включая HER2, HER3, димеры HER2:HER3, херегулин и другие потенциальные биомаркеры)

**ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ**

25

Открытое международное многоцентровое клиническое исследование 2 фазы проводили, чтобы оценить эффективность комбинаций на основе MCLA-128 в двух популяциях с метастатическим раком молочной железы (МРМЖ), HER2-положительным/амплифицированным. Оценивали две комбинации лечения в 15 -

30 20 клинических центрах в 7 странах Европы и США.

Пациенты с HER2-положительным/амплифицированным МРМЖ, у которых подтверждена сверхэкспрессия HER2 по статусу иммуногистохимии (ИГХ) 3+ или ИГХ 2+ в комбинации с положительной флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), у которых наблюдалось прогрессирование по RECIST версии 1.1 на 2 - 4 линиях направленной против HER2 терапии в условиях лечения адьювантом/неоадьювантом, неоперабельного местнораспространенного/метастатического рака, включая трастузумаб с пертузумабом и АЛК против HER2, были пригодны для участия в исследовании. Для включения в исследование опирались на статус HER2, указанный в медицинской документации, и пригодность к участию в исследовании впоследствии подтверждали в максимально короткие сроки путем проверки центральной лабораторией. Пациентов, которых задним числом признали непригодными для участия в исследовании, невозможно оценить в рамках первичной цели, и их можно заменить. Необходимо обеспечить доступность документального визуализационного подтверждения прогрессирования заболевания на последней предшествующей линии терапии, когда это возможно.

Изначально MCLA-128 вводят с трастузумабом (двухкомпонентная комбинация). Безопасность проверяется Независимым комитетом по мониторингу данных (НКМД). После оценки безопасности двухкомпонентной комбинации оценивают MCLA-128 + трастузумаб + винорелбин (трехкомпонентную комбинацию) параллельно с двухкомпонентной комбинацией (см. фигуру 61).

Как двухкомпонентную, так и трехкомпонентную комбинации оценивали в двух этапах с исходной оценкой безопасности на 4 - 6 пациентах, которых проверял НКМД, с последующим расширением когорты для исследования эффективности, как описано ниже. Решение о переходе/не переходе к трехкомпонентной комбинации принимал НКМД после оценки безопасности двухкомпонентной комбинации у пациентов. Расширение когорты для исследования эффективности обеих комбинаций продолжается параллельно.

*Вводная оценка безопасности.* После того, как 4 - 6 пациентов получили по меньшей мере 2 полных цикла (6 недель) MCLA-128 + трастузумаб, НКМД

проводил проверку безопасности. Если двухкомпонентную комбинацию считали безопасной, то начинали вводную оценку безопасности трехкомпонентной комбинации. НКМД оценивал безопасность трехкомпонентной комбинации после того, как 4 - 6 пациентов получили по меньшей мере 2 полных цикла (6 недель)

5 MCLA-128 + трастузумаб + винорелбин.

На основании наблюдаемой безопасности у первых 4 - 6 пациентов (нежелательные явления (НЯ), серьезные нежелательные явления (СНЯ), их отношение к исследуемому лекарственному средству и другие клинически значимые параметры (например, лабораторные показатели), доступные данные о  
10 ФК, иммуногенности и цитокинах) НКМД, исследователи и спонсор принимают решение о возможном дополнительном вводном периоде для оценки безопасности каждой комбинации (т.е. двухкомпонентной и трехкомпонентной).

Расширение. После вводной оценки безопасности каждую  
15 комбинированную терапию, которую НКМД счел переносимой, расширяли до 40 пациентов, подходящих для оценки эффективности.

## ИССЛЕДУЕМАЯ ПОПУЛЯЦИЯ

### 20 Критерии включения

Пациенты должны удовлетворять всем следующим требованиям, чтобы их включили в данное исследование:

- 25 1. Подписанное информированное согласие перед началом любых процедур исследования.
2. Женщины с гистологически или цитологически подтвержденным раком молочной железы с признаками метастатического или местнораспространенного заболевания, не поддающегося какому-либо  
30 местному направленному на излечение вмешательству:

- 5 а. Документально подтвержденная сверхэкспрессия/амплификация HER2, определенная как положительная по иммуногистохимии (ИГХ) 3+, или ИГХ 2+ в комбинации с положительной флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), на основании локального анализа наиболее позднего биоптата опухоли (предпочтительно метастатической, или же первичной), либо свежего, либо архивного, собранного в течение 12 месяцев до проведения скрининга.
- 10 б. Документально подтвержденное прогрессирование заболевания (по оценке исследователя) на 2 - 4 линиях направленной против HER2 терапии в условиях лечения адъювантом/неоадъювантом, неоперабельного местнораспространенного/метастатического рака; трастузумаб плюс пертузумаб и конъюгат антитела против HER2 с лекарственным средством (например, T-DM1) - все должны были быть введены ранее (в любой последовательности).
- 15 3. Измеримое с помощью рентгенологических способов заболевание, что можно определить по RECIST версии 1.1, во время или после наиболее поздней линии терапии.
4. Возраст  $\geq 18$  лет на момент подписания информированного согласия.
5. Показатель общего состояния по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG), равный 0 или 1.
- 20 6. Ожидаемая продолжительность жизни  $\geq 12$  недель по мнению исследователя.
7. Фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ)  $\geq 50\%$  по данным эхокардиограммы (ЭхоКГ) или многопроекционного радиоизотопного сканирования (MUGA).
- 25 8. Нормальное функционирование органов:
- а. Абсолютное число нейтрофилов (АЧН)  $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$
- б. Гемоглобин  $\geq 9$  г/дл
- в. Тромбоциты  $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$
- д. Кальций в сыворотке в пределах нормы (или скорректирован пищевыми добавками)
- 30 е. Аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ)  $\leq 2,5$  x верхней границы нормы (ВГН) и общий билирубин  $\leq 1,5$  x ВГН (в

случае вовлечения печени допускается АЛТ/АСТ  $\leq 5$  x ВГН и общий билирубин в пределах нормы)

- f. Креатинин в сыворотке  $\leq 1,5$  x ВГН или клиренс креатинина  $\geq 60$  мл/мин, рассчитанный по формуле Кокрофта-Голта или по формуле MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) для пациентов в возрасте  $> 65$  лет
- g. Альбумин в сыворотке  $> 3,0$  г/дл

## ИССЛЕДУЕМОЕ И СОПУТСТВУЮЩЕЕ ЛЕЧЕНИЕ

- 10 MCLA-128: 750 мг внутривенной постоянной дозы, которую вводят в течение 2 часов в день 1 раз в 3 недели (q3w).

Премедикация парацетамолом/ацетаминофеном, антигистаминами и кортикостероидами (в соответствии со стандартной практикой) является обязательной для каждого введения MCLA-128 путем инфузии.

- 15 Трастузумаб: 8 мг/кг нагрузочной дозы вводят внутривенно в течение 90 минут в день 1 цикла 1, затем, начиная с цикла 2, вводят внутривенно 6 мг/кг в течение 30 - 90 минут в день 1 каждого цикла, q3w. Для пациентов, которым проводят вводную оценку безопасности, введение трастузумаба отсрочивают на день 2 цикла 1.

- 20 Винорелбин: 25 мг/м<sup>2</sup> вводят внутривенно в течении 10 минут, в дни 1 и 8, каждые 3 недели. Для пациентов, которым проводят вводную оценку безопасности, введение винорелбина отсрочивают на дни 2 и 9 цикла 1.

## СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ

- 25 Для всех комбинаций цикл считали состоящим из 3 недель. Проводили наблюдение в течение 6-часового периода после начала инфузии первичной дозы MCLA-128 и/или трастузумаба и в течение 2-часового периода для всех последующих введений.

- 30 **Двухкомпонентная комбинация (см. фигуру 62):**

- Вводная оценка безопасности (4 - 6 пациентов): в цикле 1 MCLA-128 вводили в день 1 и трастузумаб вводили в день 2. Начиная с цикла 2, трастузумаб вводили в день 1 через 30 минут после завершения введения MCLA-128.
- Расширение: для всех циклов MCLA-128 вводили в день 1, а затем вводили трастузумаб через 30 минут после завершения инфузии MCLA-128.

### **Трехкомпонентная комбинация (см. фигуру 63):**

- Вводная оценка безопасности (4 - 6 пациентов): в цикле 1 MCLA-128 вводили в день 1, а через 30 минут вводили трастузумаб, и винорелбин вводили в дни 2 и 9. Начиная с цикла 2, винорелбин вводили в день 1 через 30 минут после трастузумаба и в день 8.
- Расширение: для всех циклов MCLA-128 вводили в день 1, затем через 30 минут вводили трастузумаб, а затем вводили винорелбин через 30 минут после завершения инфузии трастузумаба.

15

Как для двухкомпонентной, так и для трехкомпонентной комбинации, если отдельный пациент не переносил введение всех лекарственных средств в один день, то для данного пациента сохраняли схему введения доз цикла 1 вводной оценки безопасности.

20

**Назначение лечения:** спонсор поочередно назначал подходящим для участия в исследовании пациентам двухкомпонентную или трехкомпонентную комбинацию, для вводной оценки безопасности или доступного расширения, для каждой комбинации.

25

### **Адаптация к лечению**

- Не допускали снижения дозы MCLA-128 или трастузумаба.
- Дозу винорелбина снижали или приостанавливали его введение в случаях уменьшения числа нейтрофилов или повышения уровней билирубина, согласно

инструкции по применению (SPC), и прерывали, если появлялась нейротоксичность степени  $\geq 2$  (NCI-CTCAE версии 4.03).

- Инфузию MCLA-128 приостанавливали в случае инфузионной реакции (IRR), и должны были окончательно прекратить при тяжелой IRR. При легких или умеренных реакциях инфузию можно было возобновить при 50% скорости инфузии и увеличить продолжительность инфузии до 4 часов.
- Введение MCLA-128 и трастузумаба можно было отложить на период максимум 6 недель между инфузиями, чтобы справиться с НЯ, в частности, при клинически значимых снижениях ФВЛЖ, признаках застойной сердечной недостаточности или постоянной диарее степени 2 или степени 3 - 4.

### **Продолжительность лечения**

Исследуемое лечение вводили до подтверждения прогрессирующего заболевания (согласно RECIST 1.1), неприемлемой токсичности, отзыва информированного согласия, нарушения пациентом режима лечения, соответствующего решения исследователя (например, клинического ухудшения), прерывания лечения на  $> 6$  последовательных недель, отмены какого-либо исследуемого лекарственного средства. Пациентов впоследствии наблюдали для оценки безопасности в течение по меньшей мере  $35 \pm 5$  дней после последнего введения исследуемого лекарственного средства и до момента восстановления/стабилизации связанной с ним токсичности, и для оценки прогрессирования заболевания и статуса выживаемости в течение 12 месяцев.

### **ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ И СОПУТСТВУЮЩАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ**

#### **Разрешенная**

- Введение парацетамола/ацетаминофена, антигистаминных средств и кортикостероидов является обязательным с каждым введением MCLA-128. В случае IRR или гиперчувствительности, пациента ведут согласно локальной клинической практике, в соответствии с клиническими показаниями.

- Всю лекарственную терапию, необходимую для поддержания хорошего самочувствия пациента и которая, как ожидают, не будет препятствовать оценке исследуемого лекарственного средства, включая поддерживающее лечение симптомов и НЯ или стандартное лечение сопутствующих состояний, можно давать пациенту по усмотрению исследователя.

### **Запрещенная**

- Сопутствующее постоянное введение пероральных кортикостероидов (>10 мг/день эквивалента преднизона), ингибиторов TNF-альфа, антител против Т-клеток (вследствие риска подавления иммунитета).
- Любые экспериментальные лекарственные средства во время исследования или за 4 недели до первой дозы исследуемого лекарственного средства.
- Системная противораковая терапия или вакцина против желтой лихорадки во время исследования или в течение 3 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства.

### **ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ/ПЕРЕНОСИМОСТИ**

- НЯ (СТСАЕ версии 4.03), СНЯ
- Лабораторные параметры: гематология, биохимия, свертывание крови, анализ мочи, цитокины
- ЭКГ, MUGA/ЭхоКГ
- История болезни, показатели жизненно важных функций, показатель общего состояния и физикальный осмотр
- Сопутствующая лекарственная терапия
- Изменения дозы (уменьшение, прерывание, отсрочивание), прекращение приема вследствие токсичности

### **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ**

Опухоль оценивали на основании КТ/МРТ с контрастом согласно RECIST 1.1 каждые 6 недель после начала лечения. Объективные ответы необходимо было подтвердить по меньшей мере через 4 недели после первого наблюдения.

Централизованную проверку результатов визуализации независимым(и) рентгенологом(-ами) проводили для всех пациентов (на этапе скрининга и в период исследования). Остеосцинтиграфию проводили в соответствии с клиническими показаниями для пациентов с метастазами в костях на момент включения в  
5 исследование или предполагаемыми поражениями в период исследования.

Опухолевые маркеры (CA15-3, СЕА, СА27-29) оценивали в день 1 каждого цикла.

### **БИОМАРКЕРЫ**

Кандидатные диагностические биомаркеры оценивали в опухолевой ткани (при  
10 скрининге, необязательно через 12 недель и в момент окончания лечения (ЕОТ)) и крови (перед введением дозы в день 1 каждые 4 цикла и в момент окончания лечения).

**Опухоль:** HER2, HER3, димеризация HER2:HER3, следующие в сигнальных путях белки (например, PIK3CA), херегулин, фосфорилирование HER2, HER3 и белков в  
15 сигнальных путях MAPK и AKT, ингибиторы экспрессии, такие как PTEN, мутации в связанных с раком генах, включая гены сигнальных путей HER2 и HER3, слияние генов с херегулином.

**Кровь:** полиморфизм Fcγ-рецептора, мутации в ДНК опухоли, циркулирующей в плазме, диагностические биомаркеры в сыворотке (например, растворимый HER2,  
20 херегулин).

### **ФАРМАКОКИНЕТИКА**

Образцы крови собирали для измерения воздействия MCLA-128 и трастузумаба на сыворотку. Для винорелбина не проводили отбор образцов для исследования ФК.

25 Отбор образцов для исследования ФК проводили в следующие моменты времени:

#### Двухкомпонентная и трехкомпонентная комбинации: MCLA-128

- Цикл 1: день 1, перед введением дозы, в момент окончания инфузии (ЕОI) и через 2, 4 и 22 часа после ЕОI, затем в любой момент времени в день 8 (или день 9 для вводной оценки безопасности трехкомпонентной комбинации для  
30 пациентов)

- Цикл 2: день 1, перед введением дозы, EOI (вводная оценка и расширение) и через 2, 4 и 22 часа после EOI, затем в любой момент времени в день 8 (только вводная оценка)
  - Циклы 3 и 5: день 1, перед введением дозы и EOI
- 5 • Каждые 4 цикла после этого: перед введением дозы

Двухкомпонентная комбинация: трастузумаб

- Цикл 1 день 1: перед введением дозы и EOI (только расширение)
- Цикл 1 день 2: перед введением дозы и EOI (только вводная оценка)
- Цикл 2 день 1: перед введением дозы и EOI (вводная оценка и расширение)

10 Трехкомпонентная комбинация: трастузумаб

- Циклы 1 и 2, день 1: перед введением дозы и EOI (вводная оценка и расширение)

## **ИММУНОГЕННОСТЬ**

- 15 Образцы крови (5 мл) собирали у всех пациентов, чтобы оценить титры в сыворотке антител против MCLA-128 перед введением дозы в день 1, перед введением дозы для циклов 1, 3, 5, каждые 4 цикла после этого и в момент окончания лечения.

## **20 ЦИТОКИНЫ**

Образцы крови собирали, чтобы проанализировать панель цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10) в сыворотке у пациентов вводной оценки безопасности, как описано далее:

Двухкомпонентная комбинация (только вводная оценка):

- 25 • Цикл 1: день 1, перед введением дозы, через 2, 4 и 22 часа после окончания инфузии (EOI) MCLA-128
- Цикл 1: день 2, перед введением дозы, через 2 часа после EOI трастузумаба
  - Цикл 2: день 1, перед введением дозы, через 2, 4 и 22 часа после EOI MCLA-128

30 Трехкомпонентная комбинация (только вводная оценка):

Циклы 1 и 2: день 1, перед введением дозы, через 2, 4 и 22 часа после EOI MCLA-128

## СТАТИСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

### 5 Объем выборки

Вводная оценка безопасности: для 4 - 6 пациентов, подлежащих вводной оценке безопасности, мощность обнаружения НЯ с истинной частотой 33% составляла от 80 до 90%.

10 Расширение для оценки эффективности: для 40 подлежащих оценке пациентов, получавших двухкомпонентную или трехкомпонентную комбинацию, получили достаточную точность, чтобы исключить 30% (нижний предел 90% доверительного интервала (CI) > 30%). Порог уровня клинической эффективности (УКЭ) через 24 недели определяли на основании допущения, что ВБП подчиняется экспоненциальному распределению со средним значением 5 месяцев

15 (клинически значимое) и 3,5 месяцев (клинически не значимое).

Конечное количество пациентов зависит от результатов безопасности и эффективности во время исследования. Предполагали включить до ~130 пациентов, что позволяло включить по 40 пациентов в каждую из двух

20 планируемых комбинированных схем лечения, при этом частота неподлежащих оценке пациентов могла составлять ~10%.

### Определения

Все конечные точки эффективности определяли и анализировали на основании оценки опухоли согласно RECIST 1.1.

25 УКЭ: доля пациентов с лучшим общим ответом: полным ответом (PrO), частичным ответом (ЧО) или стабилизацией заболевания (СЗ)  $\geq$  24 недель.

ЧОО: доля пациентов с лучшим общим ответом PrO или ЧО.

ВБП: время, прошедшее от начала лечения до рентгенологического прогрессирования или смерти вследствие любой причины.

Отношение ВВП: отношение ВВП предшествующей схемы лечения к ВВП при исследуемом лечении.

ПрО: время, прошедшее от начала ответа (ПО или ЧО) до момента прогрессирования или смерти вследствие присутствующего рака.

- 5 ОВ: время, прошедшее от начала лечения до момента смерти вследствие любой причины.

### **Конечные точки**

#### Первичная

- 10 УКЭ по рентгенологической оценке исследователем через 24 недели

#### Ключевая вторичная

УКЭ через 24 недели согласно централизованной проверке и ЧОО, ВВП и ПО по усмотрению исследователя и централизованной проверки

#### Другая вторичная:

- 15 *Безопасность*: частота, тяжесть и взаимосвязь НЯ, лабораторных отклонений от нормы, СНЯ, измерений ЭКГ и ФВЛЖ и показателей жизненно важных функций

*Переносимость*: прекращение приема вследствие НЯ, изменения дозы вследствие НЯ, иммуногенность и оценка цитокинов

*Другая эффективность*: ОВ

- 20 *Фармакокинетика*:  $C_{max}$ ,  $C_{0h}$ , площадь под кривой,  $CL$ ,  $V_{ss}$ ,  $t_{max}$  и  $t_{1/2}$  для MCLA-128 и  $C_{EOI}$  и  $C_{0h}$  для трастузумаба.

### **Анализируемые популяции**

- 25 Подвергнутая лечению популяция: пациенты, которые получают по меньшей мере одну дозу MCLA-128.

Подходящие для оценки эффективности: пациенты, которые получили по меньшей мере 2 полных цикла (6 недель) лечения и прошли оценку в момент включения в исследование и одну оценку опухоли в период исследования, или которые прервали лечение раньше вследствие прогрессирования заболевания.

## Анализы

Распределение пациентов и демографические данные анализировали в подвергнутой лечению популяции, эффективность анализировали в подходящей для оценки эффективности популяции и безопасность анализировали в 5 подвергнутой лечению популяции.

Количественные переменные кратко представлены с применением описательной статистики. Непрерывные переменные представлены в виде  $N$ , среднего значения и/или срединного значения, стандартного отклонения, диапазона. Категориальные переменные представлены с применением частот и процентного состава.

10 Критерии для успешной первичной конечной точки: срединное значение ВВП, равное 5 месяцев, считали релевантным, при этом порог активности для УКЭ через 24 недели устанавливали на 45%.

УКЭ и ЧОО кратко представлены с соответствующим 90% точным ДИ для биномиального распределения.

15 Для ВВП, ОВ и ПрО функцию выживаемости оценивали, применяя метод множительных оценок Каплана-Мейера; оценки вероятности и 90% ДИ приведены в определенные моменты времени; срединное значение продолжительности и 90% ДИ также предложены. ПрО оценивали только для пациентов, ответивших на лечение.

20 НЯ приведены в таблице под терминами, предпочтительно используемыми в Медицинском словаре для нормативно-правовой деятельности (MedDRA®), и сгруппированы по классу органа в соответствии с частотой и тяжестью. Тяжесть НЯ основывалась на СТСАЕ 4.03.

25 ФК, иммуногенность, цитокины и биомаркеры анализировали централизованно и описывали отдельно.

## Таблицы.

30 **Титры в сыворотке у различных когорт иммунизированных мышей, определенные с помощью FACS. D = день определения титра антитела. Таблица 1: ответ против HER2. Таблица 2: ответ против HER3. Используемые**

линии клеток указаны (MCF7, SKBR3, BT474). В столбцах приведены значения для разных мышей.

**Таблица 1. Ответ против HER2.**

ErbB2	K562						MCF7						SKBR3						BT474					
A, D35	236	168	315	148	116	145	5909	5728	6147	5491	4838	4930	67748	29537	45315	44737	33508	38356	38707	18928	27240	24784	17659	18713
C, D42	163	144	154	152	166		2574	3212	2140	2346	2172		15448	17188	12627	12432	12067		10259	9669	7789	6618	6030	
E, D35	129	134	152	132	147	157	6214	5542	5625	5634	4812	3905	27730	19765	26863	26232	19478	33968	12716	17413	19139	18317	16397	12787
G, D52	145	129	126	133	163		5752	5088	4268	4899	5240		22769	26157	16726	14633	15783		19413	16640	16424	16959	18633	
	Среднее D0 130,8						Среднее D0 194,4						Среднее D0 300,2						Среднее D0 241					
	5x 654						5x 972,2						5x 1501						5x 1205					
	10x 1308						10x 1944						10x 3002						10x 2410					
	20x 2616						20x 3889						20x 6004						20x 4819					
	30x 3924						30x 5833						30x 9009						30x 7229					

5

**Таблица 2. Ответ против HER3.**

ErbB3	K562						MCF7						SKBR3						BT474					
B, D56	332	356	453	535	417	645	1630	1236	3251	1401	1297	1814	1666	1100	3072	1199	1268	1503	1675	1204	3393	1380	1295	1725
D, D56	336	445	277	185	319		1159	3260	959	643	2362		964	2180	721	510	1577		1030	3754	945	584	2042	
F, D35	265	245	249	285	291	262	4370	3985	3445	3428	3579	2718	4139	3378	2676	2659	2674	2414	4618	3690	3522	3144	3208	2776
H, D52	263	289	233	271	242		4083	4239	2970	4167	4584		5183	4319	3256	5408	5474		6326	4920	4542	6653	6938	
	Среднее D0 130						Среднее D0 172						Среднее D0 200						Среднее D0 222					
	2.5x 326						2.5x 430						2.5x 501						2.5x 556					
	5x 651						5x 859						5x 1002						5x 1112					
	10x 1303						10x 1718						10x 2004						10x 2223					
	20x 2605						20x 3437						20x 4008						20x 4446					

### 10 Таблица 3

Разделение на группы антител к HER2 в зависимости от их реакционной способности в отношении химер HER2 цыпленка/человека и реакционной способности в отношении HER2 мыши. «Количество» указывает на количество уникальных антител в каждой группе.

15

Группа	Реакционная способность в отношении домена	Количество
1	Специфические в отношении домена I	25
2	Специфические в отношении домена II	2

3	Специфические в отношении домена III	23
4	Специфические в отношении домена IV	7
5	Специфические в отношении домена IV + перекрестно реагирующие с антигеном мышы	2
6	Вступающие в реакцию со всеми конструкциями	2
7	Вступающие в реакцию только с антигеном ДТ человека	4

**Таблица 4**

Конкурентный ELISA с применением IgG и фаговых антител. В конкурентном анализе использовали четыре антитела IgG: два антитела к HER2, распознающие домен IV (трастузумаб и PG1849); одно антитело, распознающее домен II (PG2971), и одно антитело отрицательного контроля против RSV. Наблюдали исчезновение сигнала, когда конкурировали фаг и антитело, кодируемые одинаковыми генами 5  
вариабельной области; т.е. MF1849 и PG1849, и MF2971 и PG2971.

	-	MF1849	MF2971	MF2708
Трастузумаб	0,046	1,02	1,115	0,044
PG1849	0,043	0,384	1,139	0,041
PG2971	0,042	1,202	0,091	0,042
МАТ против RSV	0,044	0,94	1,003	0,047
-	0,045	1,432	1,481	0,038

10 **Таблица 5**

Разделение на группы антител к HER3 в зависимости от их реакционной способности в отношении химер HER2 крысы/человека и реакционной способности в отношении HER3 и HER3 другого вида. «Количество» указывает на количество уникальных антител в каждой группе.

Группа	Реакционная способность	Количество
--------	-------------------------	------------

1	Высокая реакционная способность в отношении домена III, реакционная способность в отношении крысы и мыши и незначительная реакционная способность в отношении домена IV	8
2	Высокая реакционная способность в отношении домена III, реакционная способность в отношении крысы, человека и яванского макака, незначительная реакционная способность в отношении домена IV	8
3	Реакционная способность в отношении HER3 крысы, яванского макака и человека	43
4	Реакционная способность в отношении HER3 человека	32
5	Вступающие в реакцию со всеми конструкциями	33

Таблица 6

Функциональная активность наиболее эффективных моноклональных антител к HER2 при концентрации IgG 1 мкг/мл. Процент активности по сравнению с эталонными антителами, т.е., трастузумабом в SKBR-3 и №Ab6 в MCF-7. Для антител к HER2 домены всех антител, за исключением PG2926, были картированы на домены I, III или IV

PG ИИ	Мишень	Группа эпитопа	Домен HER2	SKBR-3	MCF-7
PG2916	HER2	1	I	58%	30%
PG2973	HER2	1	I	49%	58%
PG3004	HER2	1	I	49%	56%
PG1849	HER2	5	IV	42%	22%
PG3025	HER2	1	I	38%	28%
PG2971	HER2	1	I	25%	51%
PG3031	HER2	1	I	33%	38%

<b>PG2926</b>	HER2	7	н/д	0%	35%
<b>PG2930</b>	HER2	3	III	0%	7%

**Таблица 7**

Функциональная активность наиболее эффективных моноклональных антител к  
 5 HER3 при концентрации IgG 1 мкг/мл в анализе зависимых от HRG MCF-7.  
 Процент активности по сравнению с эталонным антителом №Ab6.

<b>PG ИИ</b>	<b>Мишень</b>	<b>Группа эпитопа</b>	<b>MCF-7</b>
<b>PG3178</b>	HER3	5	162%
<b>PG3163</b>	HER3	5	119%
<b>PG3176</b>	HER3	5	68%
<b>PG3099</b>	HER3	3	н/д

**Таблица 8**

Окрашивание в анализе FACS антител к HER2, в которых VH HER2 используется  
 10 в комбинации с легкой цепью, отличной от общей легкой цепи, указанной на  
 фигуре 16. MFI указывает на среднюю интенсивность флуоресценции при анализе  
 FACS. Номер MF HER2 указан в скобках, связывающие HER2 клоны в контексте  
 отличной легкой цепи указаны серым цветом.

<b>PG№</b>	<b>MFI Клетки K562 (отр.контроль)</b>	<b>MFI K562 HER2</b>
PG4462 (MF2971)	267	14900
PG4463 (MF3958)	248	15600
PG4474 (MF2916)	254	14700
PG4478 (MF2973)	254	18000
PG4481 (MF3004)	267	16200
PG4482 (MF3025)	299	12000
PG4483 (MF3031)	260	14900
PG4465 (MF1849)	270	249
МАТ против HER2	309	7618
МАТ против RSV	263	276

Таблица 9

Функциональная активность главных биспецифических антител к HER2 x HER3 (обозначены с применением префикса PB; каждое PB содержит плечо против HER2 и плечо против HER3, как указано в таблице) по сравнению с антителами сравнения в анализе зависимых от HRG MCF-7 и VxPC3. На основании профилей связывания при применении химерных конструкций против HER2 и HER3, антитела можно разделить на различные группы. Для антител против HER2 домены всех антител, за исключением PG2926, можно картировать на домены I, III или IV.

Название	Плечо против HER2	Домен HER2	Плечо против HER3	Группа HER3	MCF-7	VxPC3
					IC50 (пМ)	% ингибирования
<b>PB3441</b>	2926	н/о	3178	5	51,7	-24%
<b>PB3443</b>	2930	III	3178	5	136	-31%
<b>PB3448</b>	1849	IV	3178	5	371	-22%
<b>PB3565</b>	2973	I	3178	5	30,9	-19%
<b>PB3566</b>	3004	I	3178	5	7,9	-20%
<b>PB3567</b>	2971	I	3178	5	46,5	-17%
<b>PB3709</b>	3025	I	3178	5	34,5	-19%
<b>PB3710</b>	2916	I	3178	5	74,2	-19%
<b>PB3883</b>	2971	I	3176	5	113	-19%
<b>PB3986</b>	3025	I	3163	5	30,7	-21%
<b>PB3990</b>	2971	I	3163	5	13	-18%
<b>PB4011</b>	2971	I	3099	3	40,2	н/п
<b>PB3437</b>	3031	I	3178	5	14	-10%
<b>PG3178</b>	н/о	н/о	3178	5	139	-17%
<i>№Ab6</i>					504	-7%
<i>трастуз. + пертуз.</i>					352	н/п
<i>трастузу маб</i>					500	-3%

**Таблица 10**

Значения аффинности моновалентного связывания антител РВ4188 и РВ3448 с HER2 и HER3, измеренные в анализе VIACORE. У обоих биспецифических антител одинаковое плечо против HER3. н/п - не проводили.

<b>РВ</b>	<b>КD на Her2 (нМ)</b>	<b>КD на Her3 (нМ)</b>
<b>РВ3448</b>	5,4*	н/п
<b>РВ4188</b>	0,16*	3,9

5

**Таблица 11**

**Группы лечения в исследовании ксенотрансплантата JMT-1**

10

Группа	N	Схема приема 1				
		Агент	Среда	мг/кг	Путь	Расписание
1#	10	ФБР	Х	-	и/п	1 р/нед x 4 (начало в день 1)
2	10	Лапатиниб	-	150	п/о	1 р/сут x 28 (начало в день 1)
3	10	РВ4188	-	2,5	и/п	1 р/нед x 4 (начало в день 1)
4	10	РВ4188	-	25	и/п	1 р/нед x 4 (начало в день 1)
5	10	Пертузумаб + трастузумаб	-	2,5	и/п	1 р/нед x 4 (начало в день 1)
6	10	Пертузумаб + трастузумаб	-	25	и/п	1 р/нед x 4 (начало в день 1)

**Таблица 12.**

Аффинности меченого  $^{125}\text{I}$  IgG против HER2xHER3 (PB4188), HER3xTT (PB9215), HER2xTT (PB9216) и герцептина (моноспецифического к HER2), которые определяли с помощью измерения аффинности стационарной культуры клеток BT-474 и SK-BR-3. Результаты были получены в трех независимых экспериментах.

	BT-474	SK-BR-3
Герцептин	$3,7 \pm 0,5$ нМ	$1,3 \pm 0,1$ нМ
PB4188	$3,2 \pm 0,5$ нМ	$2,0 \pm 0,4$ нМ
HER2xTT	$3,9 \pm 0,6$ нМ	$2,3 \pm 0,7$ нМ
HER3xTT	$0,23 \pm 0,08$ нМ	$0,99 \pm 0,4$ нМ

**Таблица 13.** Средние реакционные способности связывания белков (и диапазоны), перечисленные для всех выявленных остатков, имеющих решающее значение. Остатки, имеющие решающее значение, участвующие в связывании PG3958Fab, идентифицировали как остатки, мутированные в клонах, которые были отрицательны по связыванию с PG3958Fab (<35% ДТ), но положительны по связыванию с контрольным МАТ 1129 (>80% ДТ). Обнаружили два дополнительных остатка, имеющих решающее значение, которые не удовлетворяли рекомендованным пороговым значениям, но мутации в которых в меньшей степени уменьшали связывание антитела. Нумерация остатков соответствует нумерации PDB ИИ 1S78.

Остаток HER2	Мутация	Связывание Fab PG3958 % от связывания ДТ (диапазон)	Связывание контрольного МАТ % от связывания ДТ (диапазон)	Обозначение
144	T144A	31,9 (11)	82,1 (13)	Решающий
166	R166A	32,2 (5)	93,7 (17)	Решающий
181	R181A	10,1 (5)	98,6 (34)	Решающий
172	P172A	52,5 (2)	94,9 (24)	Вторичный
179	G179A	41,7 (18)	87,9 (25)	Вторичный

**Таблица 14.** Средние реакционные способности связывания белков (и диапазоны) перечислены для обоих остатков, имеющих решающее значение. Остатки, имеющие решающее значение, участвующие в связывании PG3178, идентифицировали как остатки, мутированные в клонах, которые были отрицательны по связыванию с МАТ PG3178 (<20% ДТ), но положительны по связыванию с контрольным МАТ 66223 (>70% ДТ). Нумерация остатков соответствует нумерации PDB ИН 4P59.

Остаток HER3	Мутация	Связывание PG3178 % от связывания ДТ (диапазон)	Связывание контрольного МАТ % от связывания ДТ (диапазон)	Обозначение
409	F409A	16,74 (8)	79,63 (0)	Решающий
426	R426A	3,17 (5)	93,08 (36)	Решающий

10

**Таблица 15.** Перечень выставленных на поверхность остатков внутри радиуса 11,2 Å от Arg 426 в HER3:

Leu 423	L423
Tyr 424	Y424
Asn 425	N425
Gly 427	G427
Gly 452	G452
Arg 453	R453
Tyr 455	Y455
Glu 480	E480
Arg 481	R481
Leu 482	L482
Asp 483	D483
Lys 485	K485

15

**Таблица 16.** Система балльной оценки для контролирования гуманных конечных точек

	<b>Показатель</b>	<b>Балл</b>	
5	<b>Изменения массы тела</b>		
	<20%	0	
	>20%	3	
10	<b>Внешний вид</b>		
	Нормальный	0	
	Недостаточный уход за поверхностью тела	1	
	Небольшие укусы или царапины. Наличие отделяемого из носа/глаз		2
	Сильные укусы или царапины. Аномальное положение тела,		
15	конечности, тремор и т.д.	3	
	<b>Неспровоцированное поведение</b>		
	Нормальное	0	
	Небольшие изменения	1	
20	Аномальное, сниженная подвижность, снижение уровня бодрствования, неактивные	2	
	Необусловленное издавание звуков, самоизувечение, либо очень беспокойное, либо неподвижное	3	
25	<b>Поведенческие ответы на внешние стимулы</b>		
	Нормальный	0	
	Небольшое подавление/усиление ответа	1	
	Умеренно аномальные ответы	2	
	Яростные реакции или коматозное состояние	3	
30	<b>Затылочная опухоль</b>		
	Нет	0	
	Пальпируемая	1	
35	<b>Суммарный балл*</b>		

\* Умерщвление мышцы при условии:

- Суммарный балл > 5, или

- Балл равен 3 для любого одного показателя, независимо от суммарного балла.

**Таблица 17.** Хронология экспериментов на животных.

	<b>Дата</b>	<b>Процедура</b>
5	03/08/16	Прибытие
	10/08/16	Окончание акклиматизации
	17/08/16	Внутричерепная инокуляция опухоли
	05/09/16	Первые процедуры МР-визуализации до начала терапии
10	09/09/16	Включение в исследование первого животного и начало терапии
	04/10/16	Включение в исследование последнего животного
	25/10/16	Последний день терапии
	12/11/16	Умерщвление последнего животного

15

**Таблица 18.** Обзор исследуемых групп и введения дозы

	<b>Группа</b>	<b>Кол-во мышей</b>	<b>Соединение</b>	<b>Доза</b>
20	A	8	Среда (солевой раствор)	4x 2 p/нед, 5 мл/кг в/в
	B	8	T-DM1	4x 1 p/нед, 10 мг/кг, разбавленный в солевом растворе, 5
25	C	8	MCLA-128	мл/кг в/в 4x 2 p/нед, 25 мг/кг, разбавленный в солевом растворе, 5 мл/кг в/в
30	D	8	T-DM1+MCLA-128	T-DM1, 10 мг/кг + MCLA, 25 мг/ кг, разбавленный в солевом растворе: 4x 1 p/нед, 5 мл/кг в/в MCLA-128: 25 мг/кг, разбавленный в солевом растворе: 4x 1 p/нед, 5 мл/кг в/в

35

**Таблица 19.** Дата включения в исследование и объем опухоли в момент включения в исследование.

	<b>Группа</b>	<b>№ мыши</b>	<b>Дата включения</b>	<b>Объем опухоли (мм3)</b>
5	A	16	09/09/2016	15,9
	A	17	09/09/2016	11,1
	A	21	13/09/2016	17,6
	A	23	13/09/2016	13,5
	A	26	13/09/2016	11,6
10	A	11	16/09/2016	11,0
	A	36	20/09/2016	9,3
	A	1	27/09/2016	9,5
	B	9	09/09/2016	12,3
	B	14	09/09/2016	16,7
15	B	25	13/09/2016	18,6
	B	35	13/09/2016	9,2
	B	24	16/09/2016	10,0
	B	5	20/09/2016	15,7
	B	32	23/09/2016	10,1
20	B	34	04/10/2016	14,4
	C	18	09/09/2016	13,7
	C	43	09/09/2016	13,2
	C	7	13/09/2016	11,2
	C	29	13/09/2016	11,4
25	C	42	13/09/2016	16,6
	C	30	20/09/2016	9,8
	C	37	20/09/2016	14,8
	C	27	04/10/2016	9,5
	D	8	09/09/2016	21,7
30	D	41	09/09/2016	12,5
	D	38	13/09/2016	15,9
	D	39	13/09/2016	10,6
	D	40	13/09/2016	9,7
	D	3	16/09/2016	11,6
35	D	31	20/09/2016	9,8
	D	19	23/09/2016	13,8

Таблица 20. Балльная оценка отека головного мозга

Группа № мыши			Балл отека головного мозга							Итоговый		
			-1	3	7	10	14	21	28	35	42	балл
5	A	01	1	2	3	3	3					3
	A	11	0	1	1	2	3					3
	A	16	0	0	1	1						1
	A	17	0	0	0	1	2					2
	A	21	1	2	2	2						2
10	A	23	1	1	1	2						2
	A	26	1	2	2	3						3
	A	36	2	2	2	2						2
	B	05	0	1	2	2	2					2
	B	09	1	1	2	3						3
15	B	14	0	0	1	2	3					3
	B	24	1	2	2	3	3	4	4			4
	B	25	0	0	1	0	2					2
	B	32	0	0	1	1	2	2	3			3
	B	34	2	2	3	3	3					3
20	B	35	0	0	1	1	2	2	3			3
	C	07	1	2	2	2	1	2	3	3	3	3
	C	18	0	0	0	0	0	1				1
	C	27	1	1	2	2	1	1				1
	C	29	1	1	2	2	3	3	4			4
25	C	30	2	2	3	3	3	3	3	3		3
	C	37	1	1	2	2	3	3	3	3		3
	C	42	0	1	1	1	1	1				1
	C	43	0	0	0	0	1	2	3			3
	D	03	0	0	1	2	2	3	3	4	4	4
30	D	08	0	0	0	1	2	3	4			4
	D	19	0	0	0	0	1	1	1	1	н/о	1
	D	31	2	3	4	4	4	4	4	4		4
	D	38	0	1	2	3	3	3	4	4		4
	D	39	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4
35	D	40	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4
	D	41	0	0	0	0	0	0	0			0

Библиографический указатель

- Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. 2011. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol. 2011 Nov 29;9(1):16-32.  
5
- Balko JM, Miller TW, Morrison MM, Hutchinson K, Young C, Rinehart C, Sánchez V, Jee D, Polyak K, Prat A, Perou CM, Arteaga CL, Cook RS. 2012. The receptor tyrosine kinase ErbB3 maintains the balance between luminal and basal breast epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 3;109(1):221-6.  
10
- Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM. 2012. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med. Jan 12;366(2):109-19.  
15
- de Kruif et al. Mol. Biol. (1995), **248**, 97-105
- Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: What the cardiologist needs to know. Nat Rev Cardiol 2010;7:564-75  
20
- Guarneri Jain KK, Casper ES, Geller NL, et al. A prospective randomized comparison of epirubicin and doxorubicin in patients with advanced breast cancer; J Clin Oncol 1985;3:818-26  
25
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, Sampath D, Sliwkowski MX. 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. Cancer Cell. May 5;15(5):429-40.  
30
- Junttila, T. T., K. Parsons, et al. (2010). "Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer." Cancer Research 70(11): 4481-4489
- Merchant et al. Nature Biotechnology, Vol. 16 July 1998 pp 677-681  
35
- Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. EMBO J. 1994 Feb 1;13(3):692-8.

- Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. 2013. HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* Feb 20;105(4):266-73.
- 5 Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM. 2007. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature.* Jan 25;445(7126):437-41.
- Schaefer et al. *Cancer Cell* 20, 472-486, October 2011
- 10 Schoeberl B, Faber AC, Li D, Liang MC, Crosby K, Onsum M, Burenkova O, Pace E, Walton Z, Nie L, Fulgham A, Song Y, Nielsen UB, Engelman JA, Wong KK. 2010. An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res.* Mar 15;70(6):2485-94.
- 15 Shames et al. *PLOS ONE*, February 2013, Vol.8, Issue 2, pp 1-10
- Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. 2004. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2004 Dec;3(12):1585-92.
- 20 Yarden Y, Pines G. 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* Jul 12;12(8):553-63.
- Thery J.-C. et al., Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies, *Eur J Cancer* (2014), Vol. 50, Issue 5, pages 892-901
- 25 Wadhwa D, Fallah-Rad N, Grenier D, et al. Trastuzumab mediated cardiotoxicity in the setting of the adjuvant chemotherapy for breast cancer: A retrospective study. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:357-64.
- 30 Wehrman TS, Raab WJ, Casipit CL, Doyonnas R, Pomerantz JH, Blau HM. 2006. A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 12;103(50):19063-8.
- 35 Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* Jul 26;487(7408):505-9.
- 40 Yonesaka et al., *Sci.transl.Med.*, Vol.3, Issue 99 (2011); pp1-11

Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* Aug;117(8):2051-8.

- 5 Greco, Bravo, Parsons (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev* 47 (2): 331-85

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация нацеленного на ErbB-2 агента; и биспецифического антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с  
5 эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, для применения в способе лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или риск развития указанной опухоли.
- 10 2. Комбинация для применения по п. 1, отличающаяся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой ингибитор связывающего ErbB-2 агента.
3. Комбинация для применения по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой ингибитор ErbB-2.
- 15 4. Комбинация для применения по п. 3, отличающаяся тем, что указанный ингибитор ErbB-2 представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2.
- 20 5. Комбинация для применения по п. 4, отличающаяся тем, что моноспецифическое антитело и биспецифическое антитело связывают различные эпитопы на ErbB-2.
- 25 6. Комбинация для применения по п. 5, отличающаяся тем, что различные эпитопы ErbB-2 находятся на различных внеклеточных доменах ErbB-2.
7. Комбинация для применения по любому из пп. 5 - 6, отличающаяся тем, что моноспецифическое антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном  
30 домене IV, домене III и/или домене II ErbB-2.

8. Комбинация для применения по любому из пп. 1 - 7, отличающаяся тем, что указанное биспецифическое антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном домене I ErbB-2.
- 5 9. Комбинация для применения по любому из пп. 4 - 8, отличающаяся тем, что моноспецифическое антитело включает конъюгат с лекарственным средством.
- 10 10. Комбинация для применения по любому из пп. 1 - 9, отличающаяся тем, что указанное биспецифическое антитело включает конъюгат с лекарственным средством.
11. Комбинация для применения по п. 9 или п. 10, отличающаяся тем, что конъюгат с лекарственным средством содержит эмтанзин.
- 15 12. Комбинация для применения по любому из пп. 4 - 11, отличающаяся тем, что моноспецифическое антитело представляет собой трастузумаб.
13. Комбинация для применения по любому из пп. 4 - 11, отличающаяся тем, что моноспецифическое антитело представляет собой трастузумаб эмтанзин.
- 20 14. Комбинация для применения по любому из пп. 1 - 13, отличающаяся тем, что указанное биспецифическое антитело включает антитело РВ4188.
- 25 15. Комбинация для применения по любому из пп. 1 - 14, дополнительно включающая введение химиотерапевтического лекарственного средства нуждающемуся в этом индивиду.
- 30 16. Способ лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоль или есть риск развития положительной по ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3 опухоли, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду нацеленного на ErbB-2 агента и биспецифического антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который

может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая нацеленный на ErbB-2 агент и  
5 биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

18. Набор из частей, содержащий нацеленный на ErbB-2 агент и  
10 биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

19. Способ лечения согласно п. 16, фармацевтическая композиция согласно п.  
15 17 или набор из частей согласно п. 18, отличающиеся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой связывающий агент или ингибитор ErbB-2.

20. Способ лечения, фармацевтическая композиция или набор из частей  
20 согласно п. 19, отличающийся тем, что связывающий агент или ингибитор ErbB-2 представляет собой лапатиниб или нератиниб.

21. Способ лечения согласно п. 16, фармацевтическая композиция согласно п.  
17 или набор из частей согласно п. 18, отличающиеся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, которое  
25 содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2.

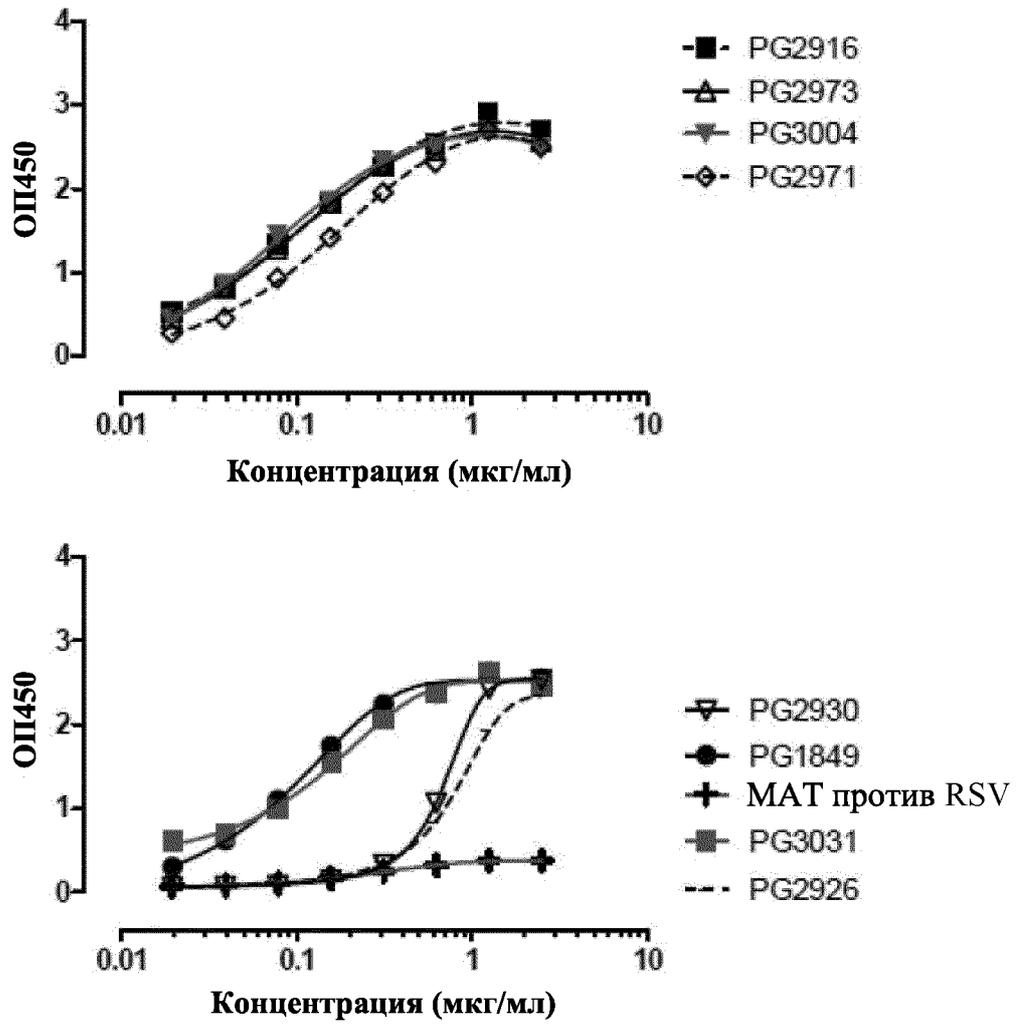
22. Биспецифическое антитело, которое содержит сайт связывания антигена,  
который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт  
30 связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, для применения для лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге

или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге.

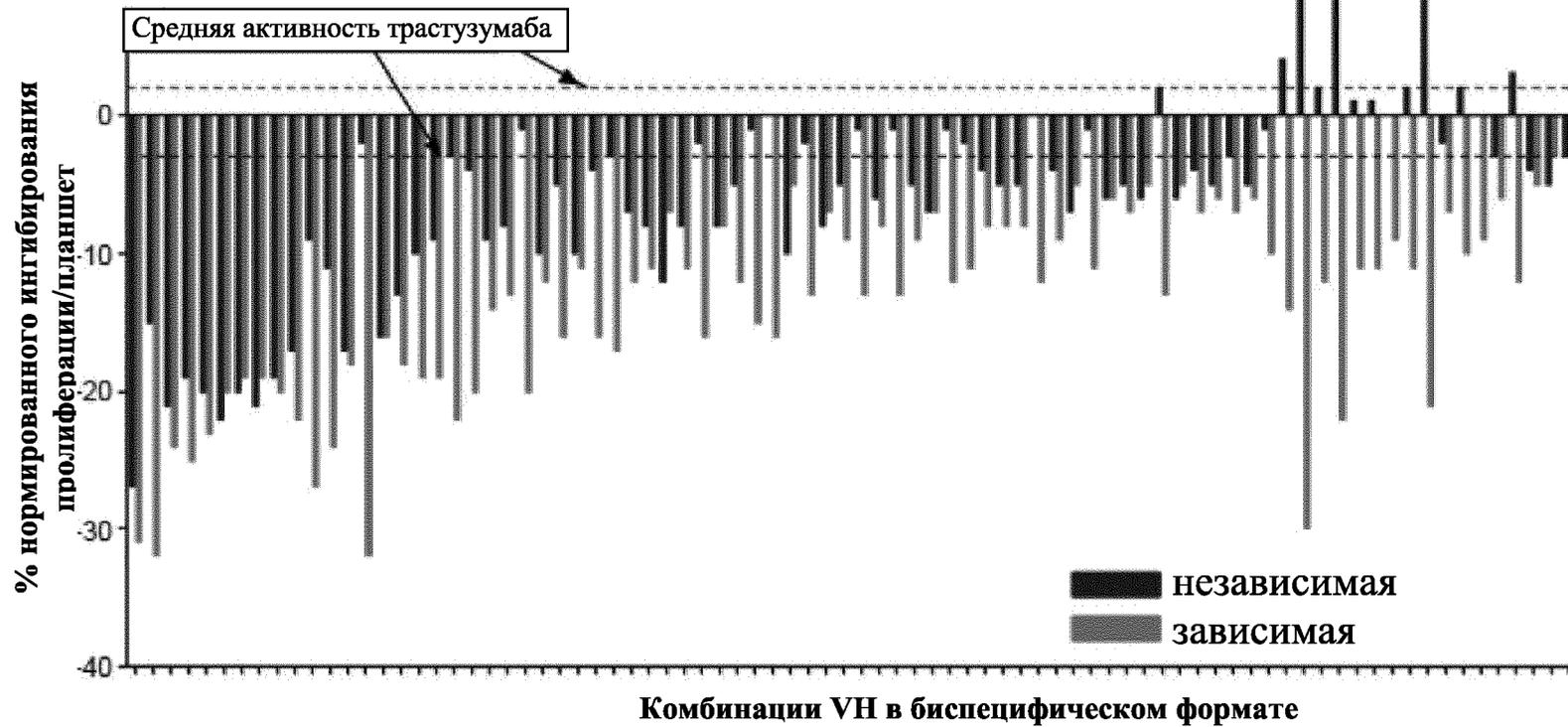
- 5 23. Биспецифическое антитело для применения по п. 22, отличающееся тем, что опухоль представляет собой метастаз опухоли молочной железы.
- 10 24. Биспецифическое антитело для применения по п. 22 или п. 23, отличающееся тем, что указанное биспецифическое антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном домене I ErbB-2.
- 15 25. Биспецифическое антитело для применения по любому из пп. 22 - 24, отличающееся тем, что указанное биспецифическое антитело может связываться с эпитопом на внеклеточном домене III ErbB-3.
- 20 26. Биспецифическое антитело для применения по любому из пп. 22 - 25, отличающееся тем, что указанный способ дополнительно включает введение нацеленного на ErbB-2 агента.
- 25 27. Биспецифическое антитело для применения по п. 26, отличающееся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой лапатиниб или нератиниб.
- 30 28. Биспецифическое антитело для применения по п. 26, отличающееся тем, что нацеленный на ErbB-2 агент представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2.
29. Биспецифическое антитело для применения согласно любому из пп. 22 - 28, отличающееся тем, что указанный способ дополнительно включает введение нацеленного на ErbB-3 агента.

30. Биспецифическое антитело для применения по п. 29, отличающееся тем, что нацеленный на ErbB-3 агент представляет собой антитело, такое как патритумаб, MM-121 (серибантумаб) или лумретузумаб.
- 5 31. Биспецифическое антитело для применения по п. 29, отличающееся тем, что указанный ингибитор ErbB-2 представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, которое содержит сайты связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.
- 10 32. Биспецифическое антитело по п. 28 или п. 31, отличающееся тем, что указанное моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2 или эпитопом на внеклеточной части ErbB-3, содержит конъюгированное лекарственное средство.
- 15 33. Биспецифическое антитело по п. 32, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство включает эмтанзин.
- 20 34. Биспецифическое антитело согласно любому из пп. 28, отличающееся тем, что моноспецифическое бивалентное антитело с сайтами связывания антигена, которые могут связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, представляет собой трастузумаб, пертузумаб или биоаналог с такой же последовательностью аминокислот переменного домена.
- 25 35. Биспецифическое антитело по любому из пп. 22 - 34, отличающееся тем, что указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело PB4188.
- 30 36. Способ лечения индивида, у которого есть положительная по ErbB-2 и положительная по ErbB-3 опухоль в головном мозге или есть риск развития положительной по ErbB-2 и положительной по ErbB-3 опухоли в головном мозге, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду биспецифического антитела, которое содержит сайт связывания антигена, который

может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-2, и сайт связывания антигена, который может связываться с эпитопом на внеклеточной части ErbB-3.

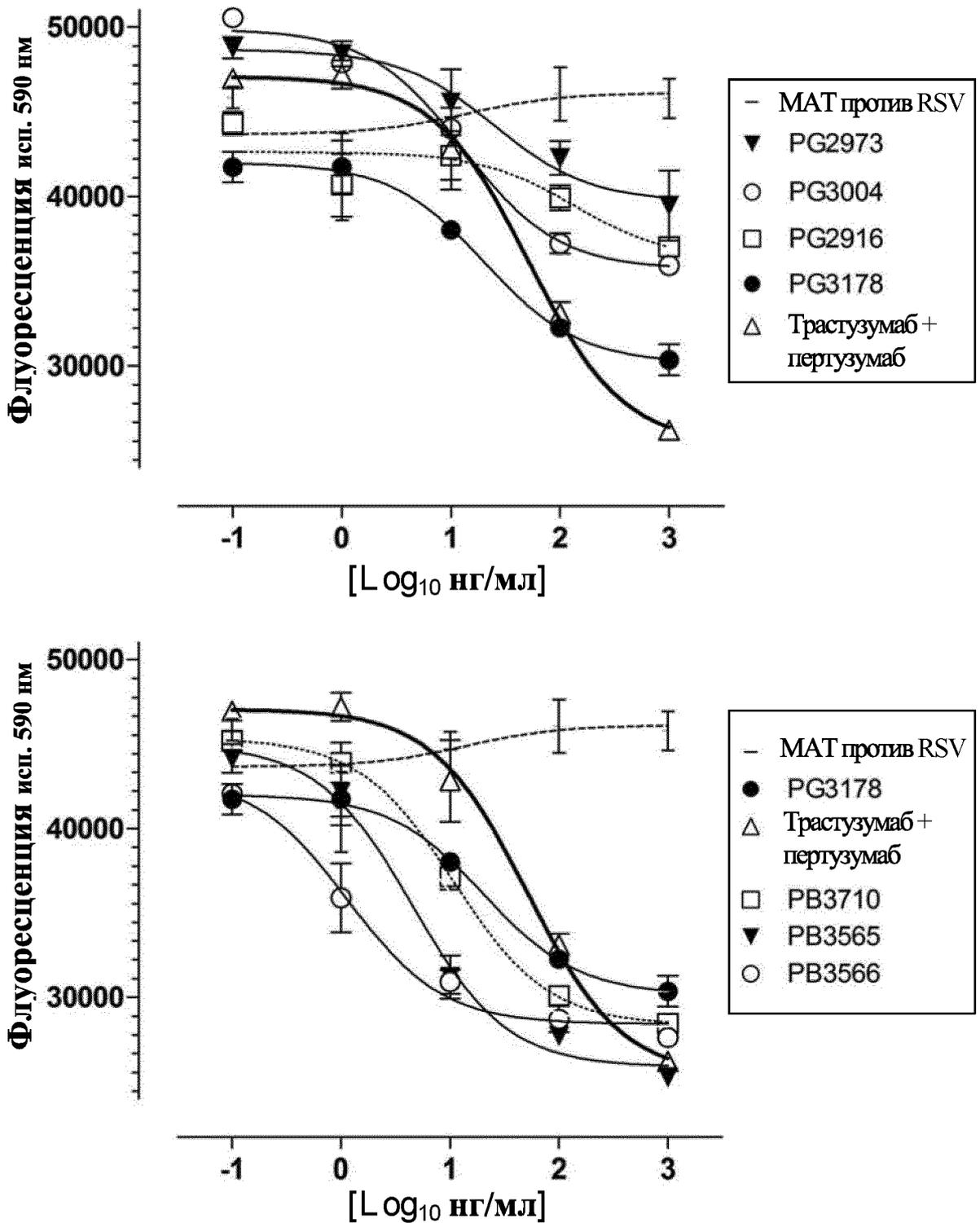


Фигура 1

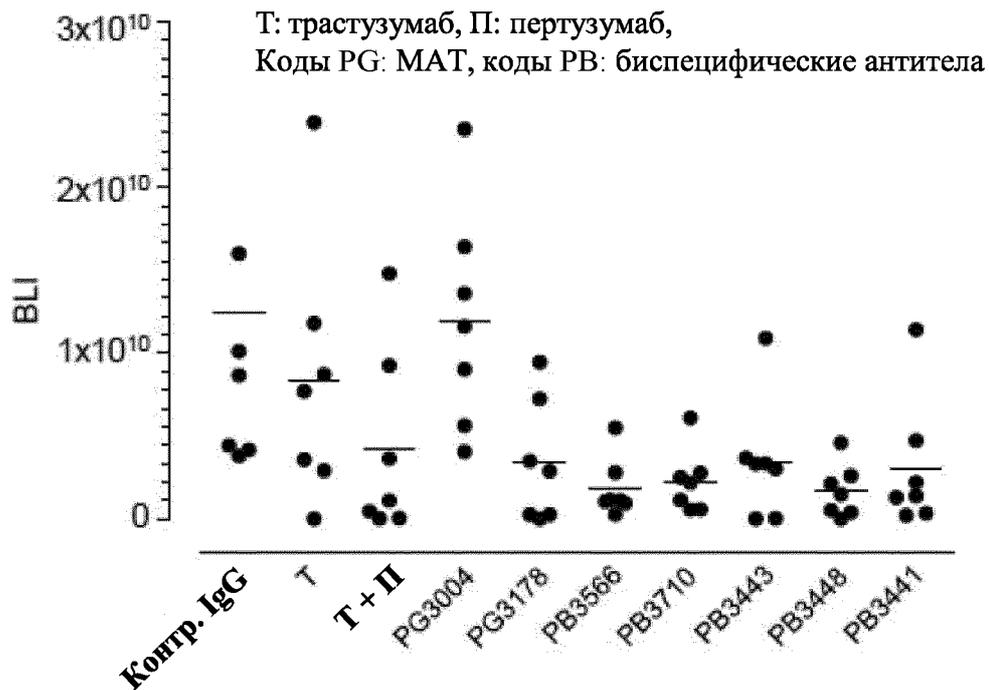


Фигура 2

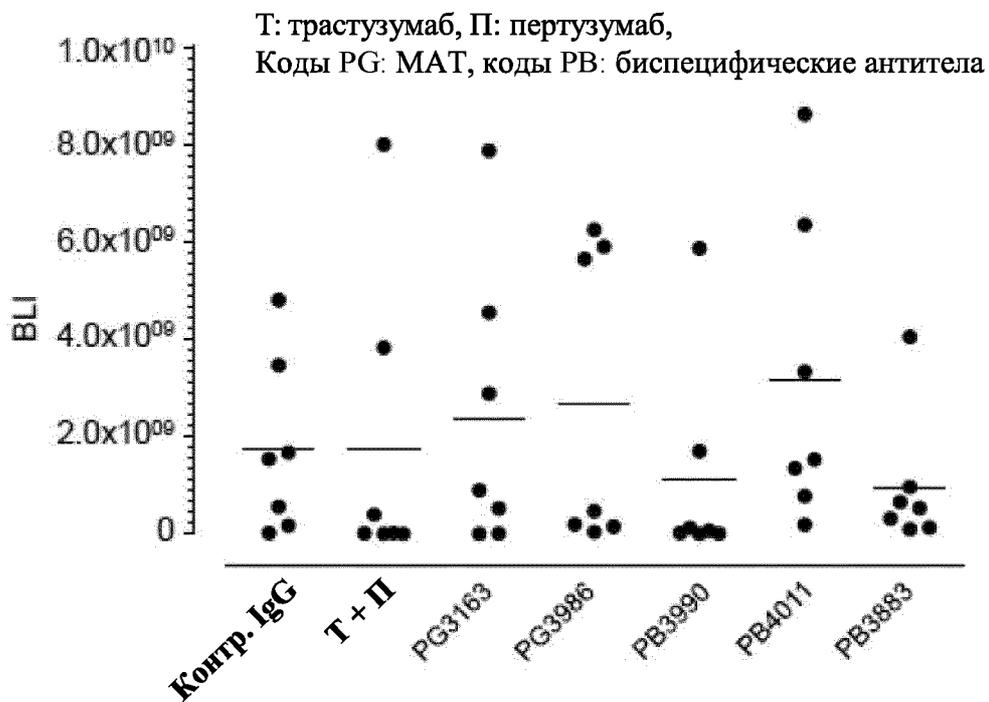
Коды PG: МАТ, коды РВ: биспецифические антитела



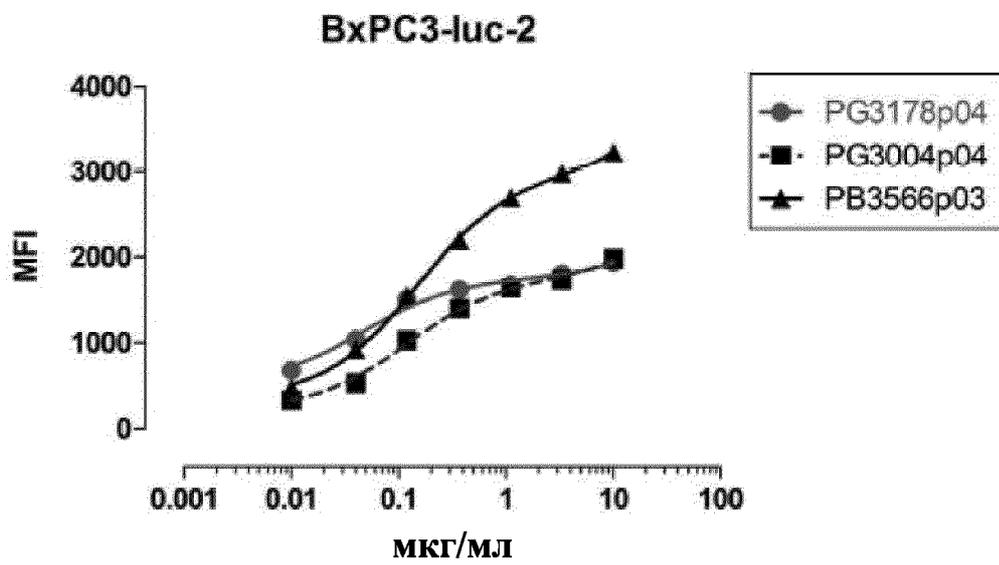
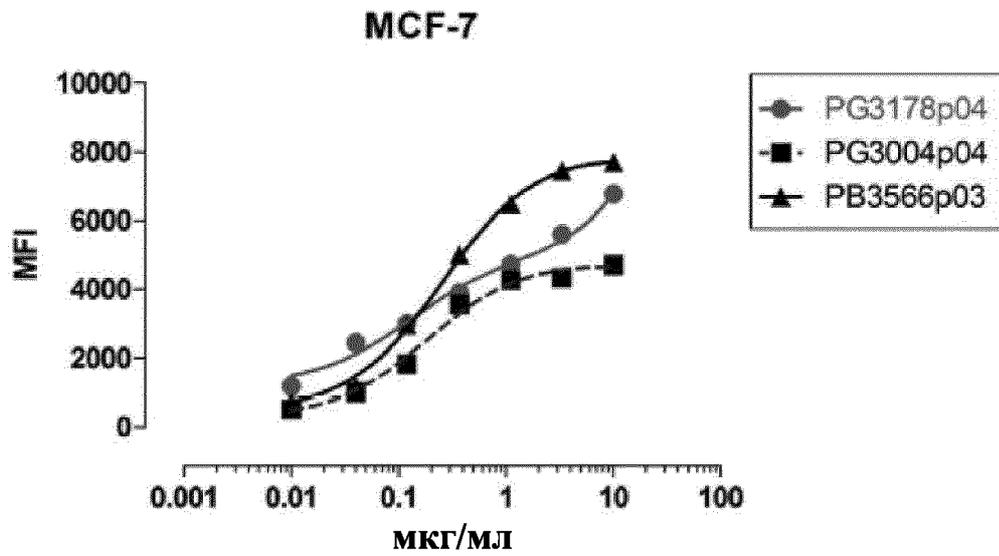
Фигура 3



Фигура 4



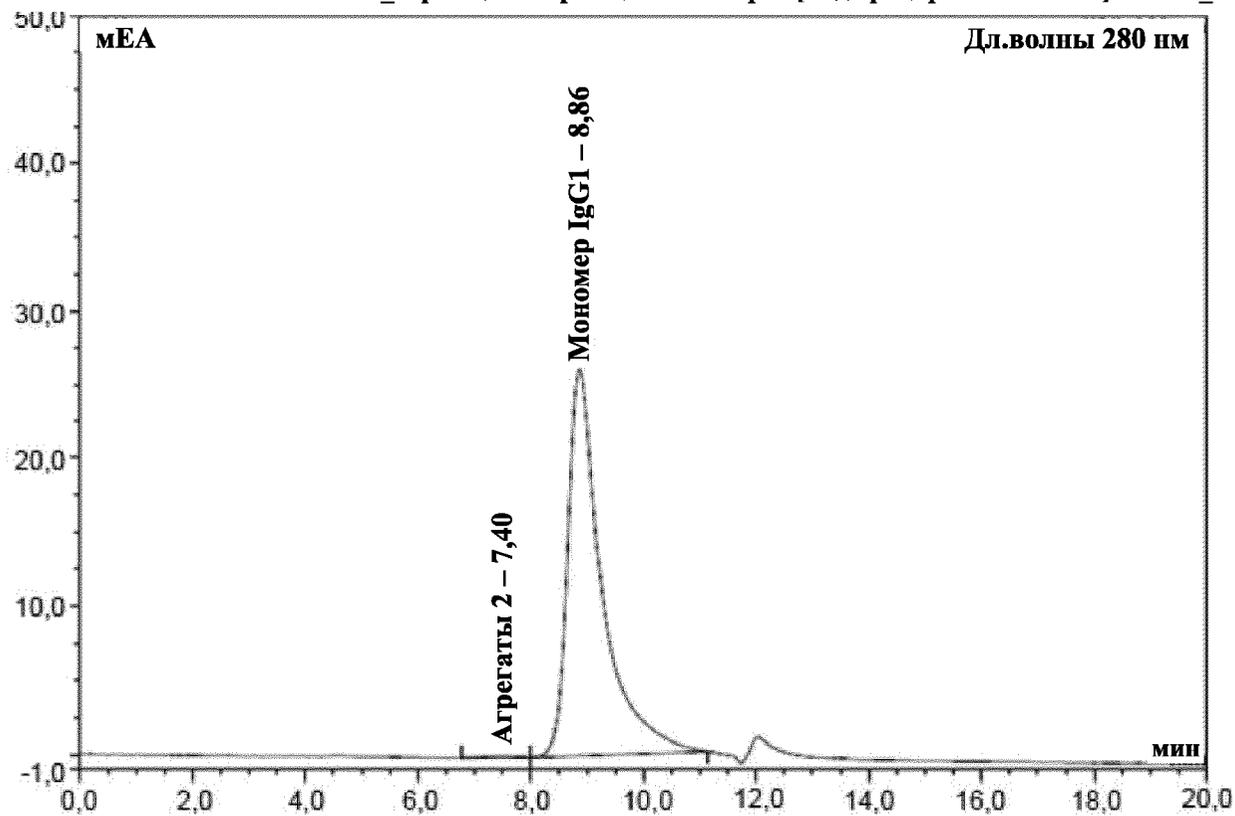
Фигура 5



Фигура 6

### ВЭЭХ; РВ 4188

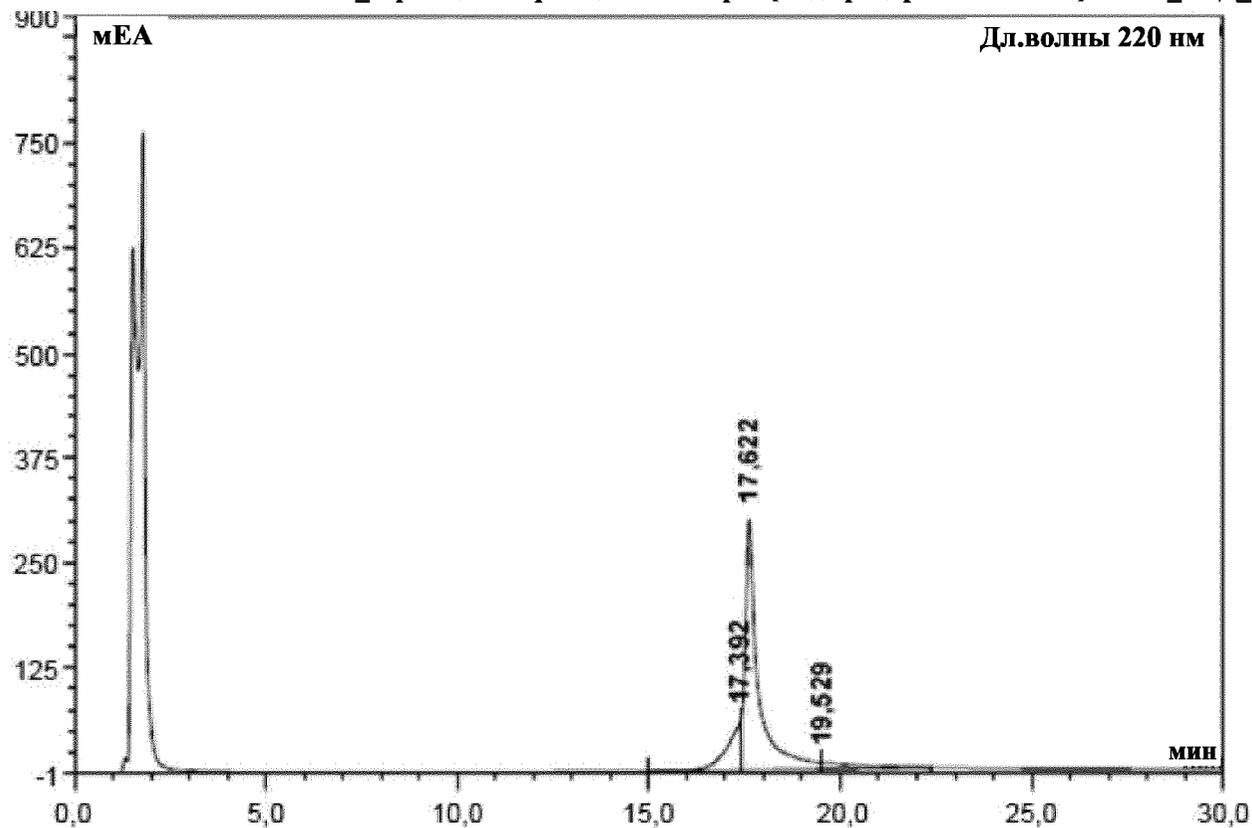
220-095 Анализ ВЭЭХ Анализ 24 янв 14\_образец #5 Образец 1: РВ4188p52 [модифицированное НТЕ] УФ\_ВИД\_1



Фигура 7

**КО-ВЭЖХ; РВ 4188**

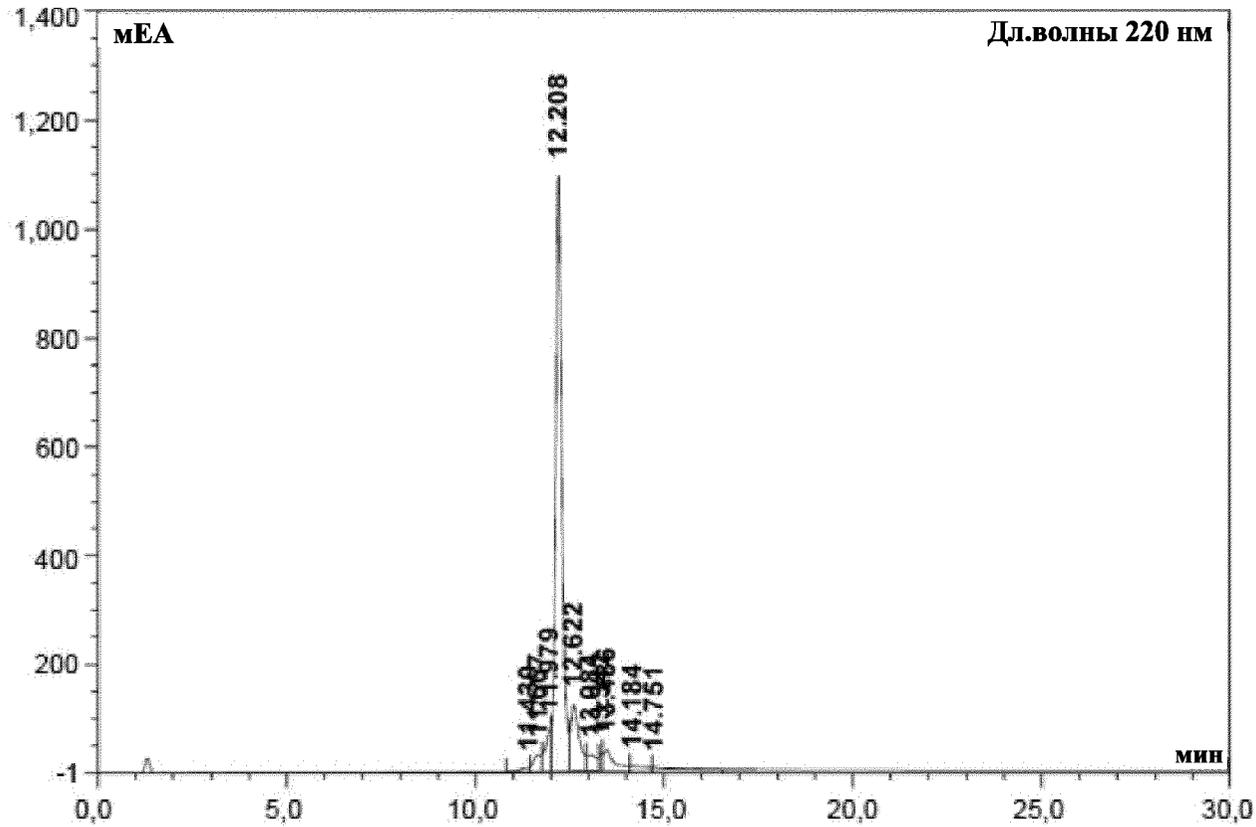
220-094 АНАЛИЗ КОХ 22 янв 14\_образец #4 Образец 1: РВ4188р52 [модифицированное НТЕ] УФ\_ВИД\_1



**Фигура 7, продолжение**

**ВЭХ; исходное моноклональное антитело против HER2**

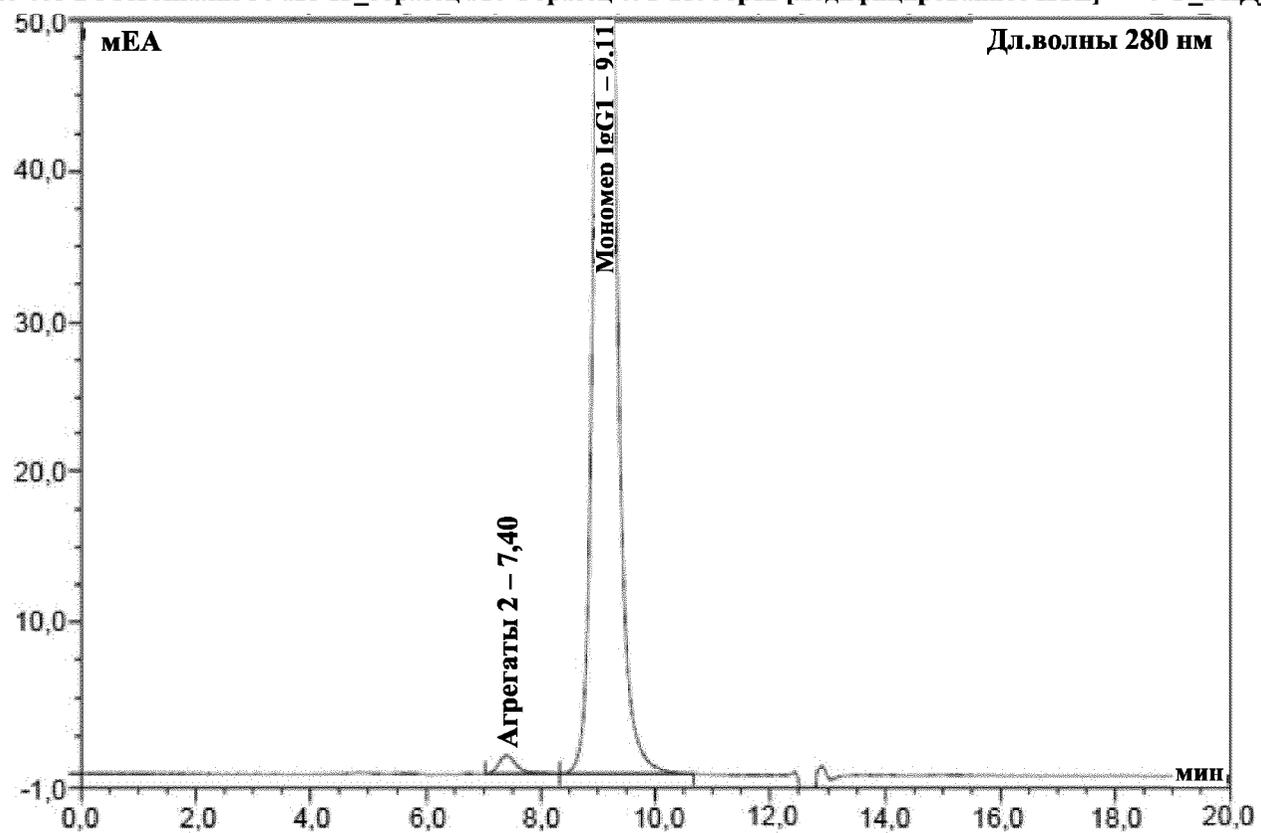
220-042 Анализ КОХ 26 авг 13\_образец #19 Образец 16: PG3958p12 [модифицированное НТЕ] УФ\_ВИД\_1



**Фигура 7, продолжение**

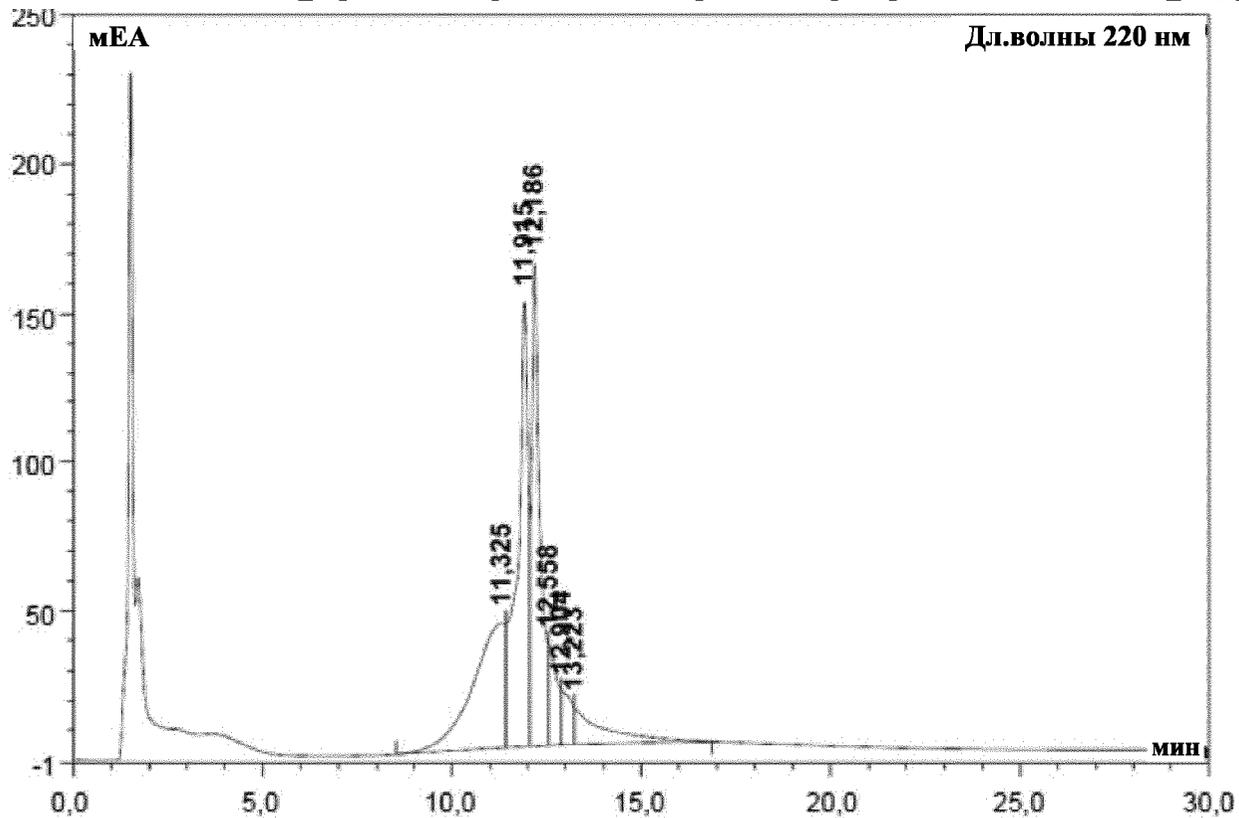
**КО-ВЭЖХ; исходное моноклональное антитело против HER2**

220-053 ВЭЭХ Анализ 30 авг 13\_образец #10 Образец 6: PG3958p12 [модифицированное НТЕ] УФ\_ВИД\_1



**Фигура 7, продолжение**

**ВЭЭХ; эталонное моноклональное IgG против RSV**  
220-086 АНАЛИЗ КОХ 23 дек 13\_образец #15 Образец 12: PG2708p171 [модифицированное НТЕ] УФ\_ВИД\_1

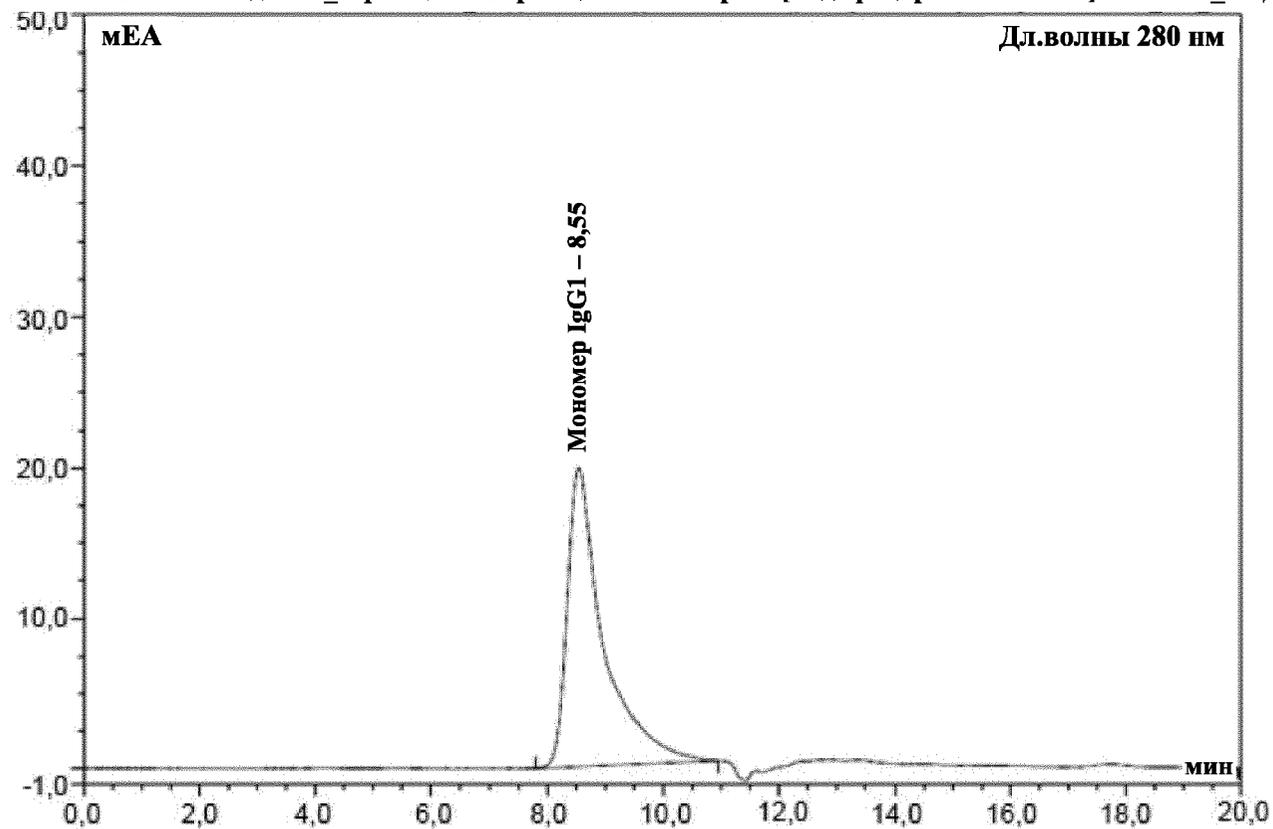


**Фигура 7, продолжение**

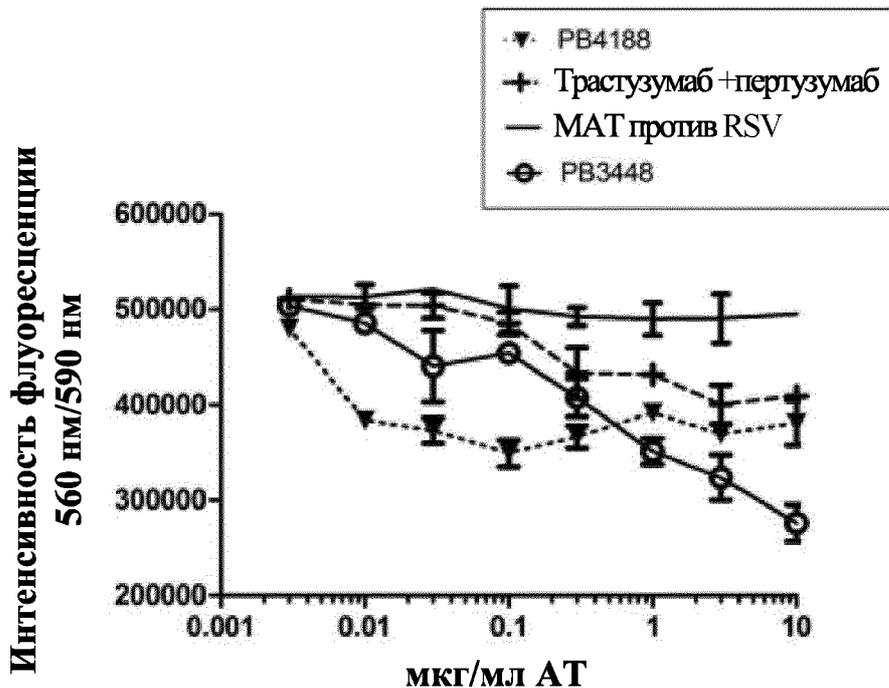
**КО-ВЭЖХ; эталонное моноклональное IgG против RSV**

220-082 АНАЛИЗ ВЭЭХ 20 дек 13\_образец #16 Образец 12: PG2708p171 [модифицированное НТЕ]

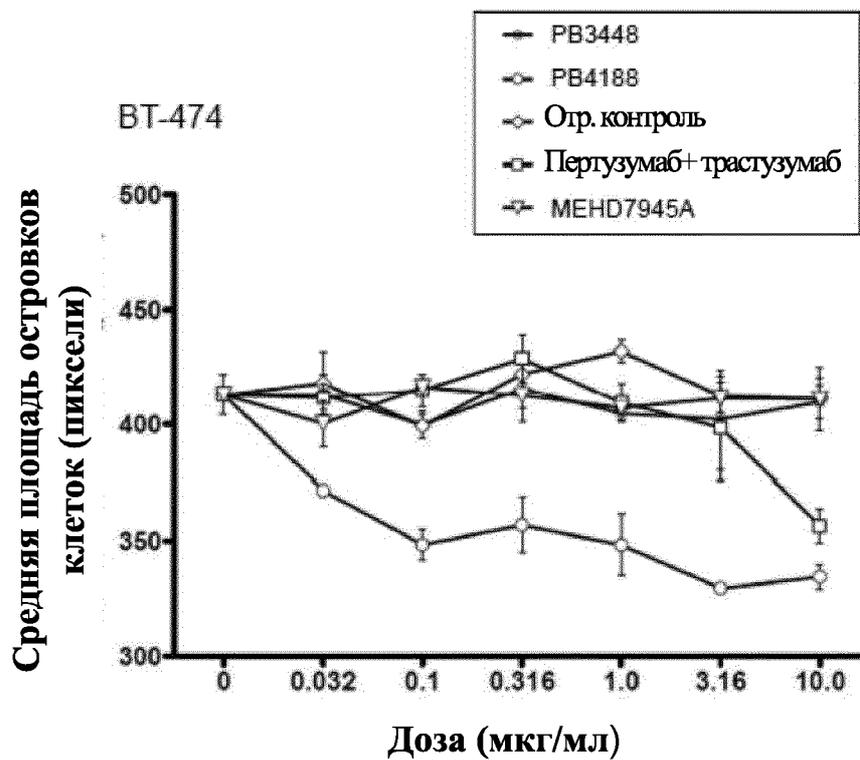
УФ\_ВИД\_1



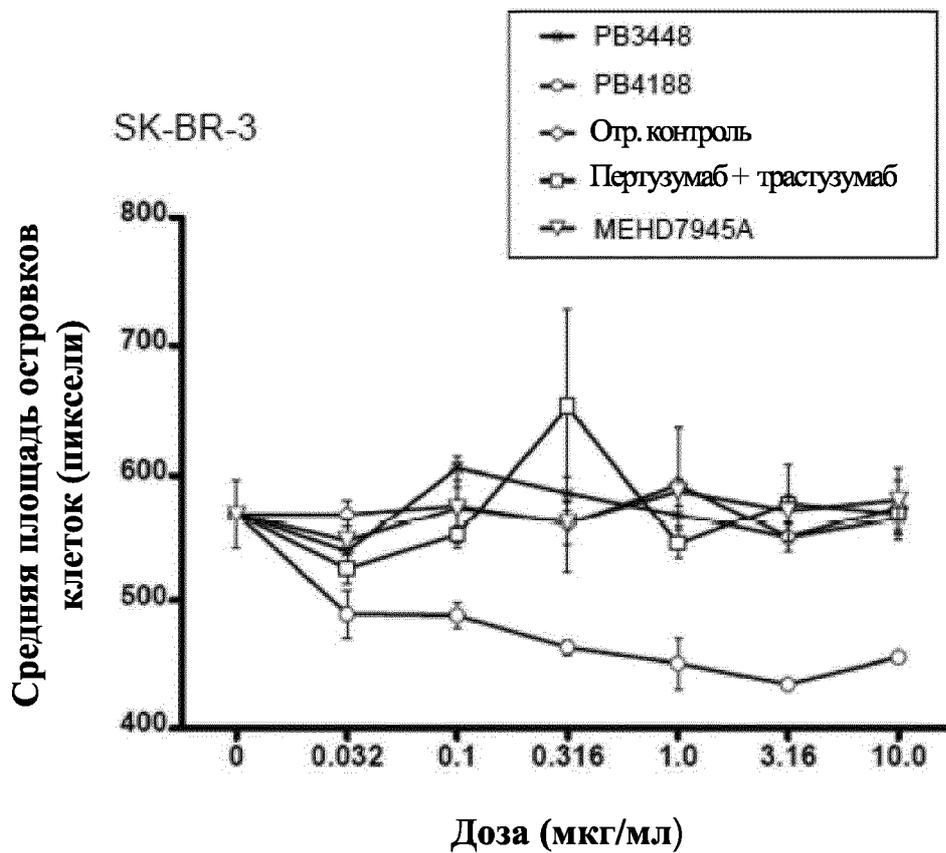
**Фигура 7, продолжение**



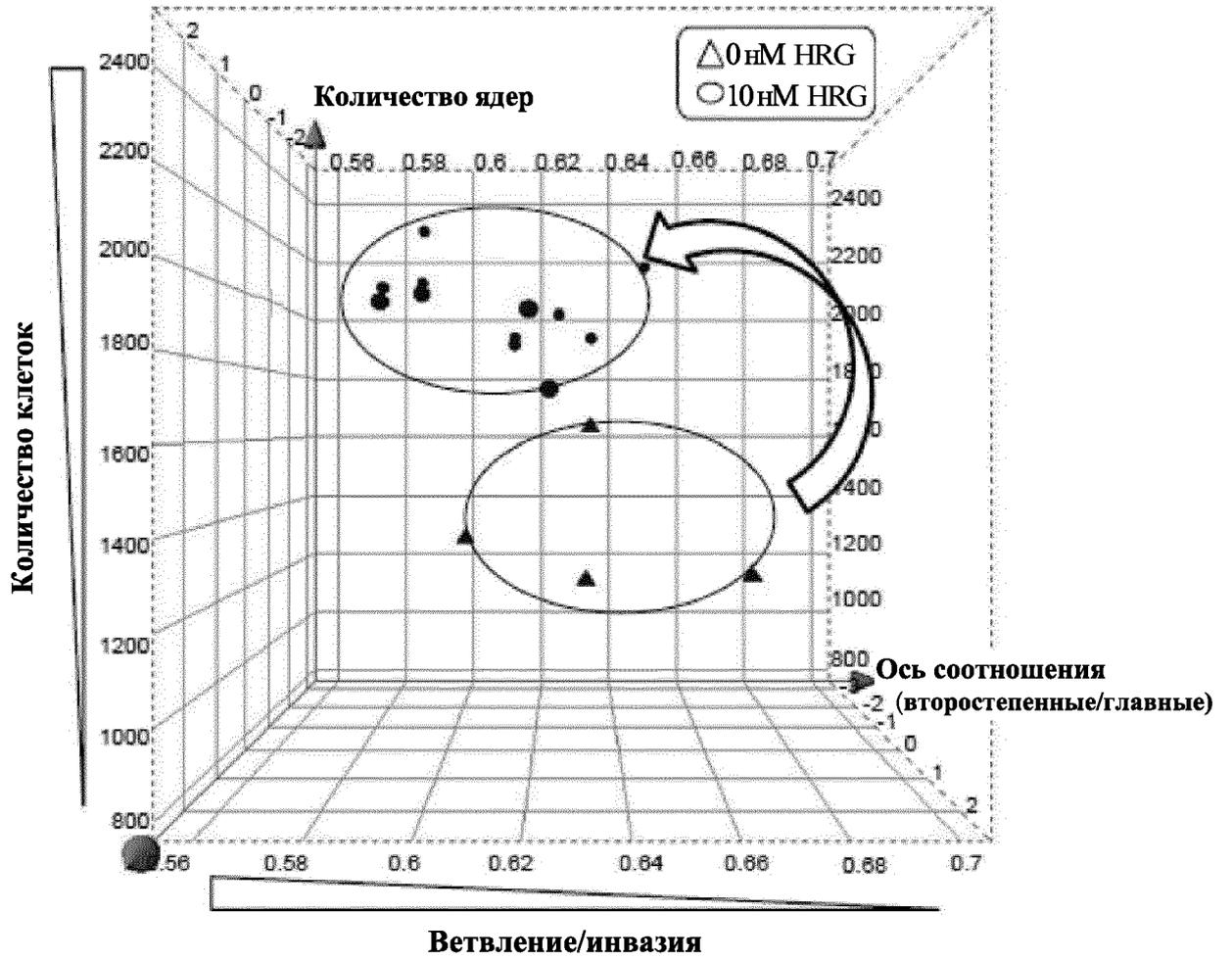
Фигура 8



Фигура 9

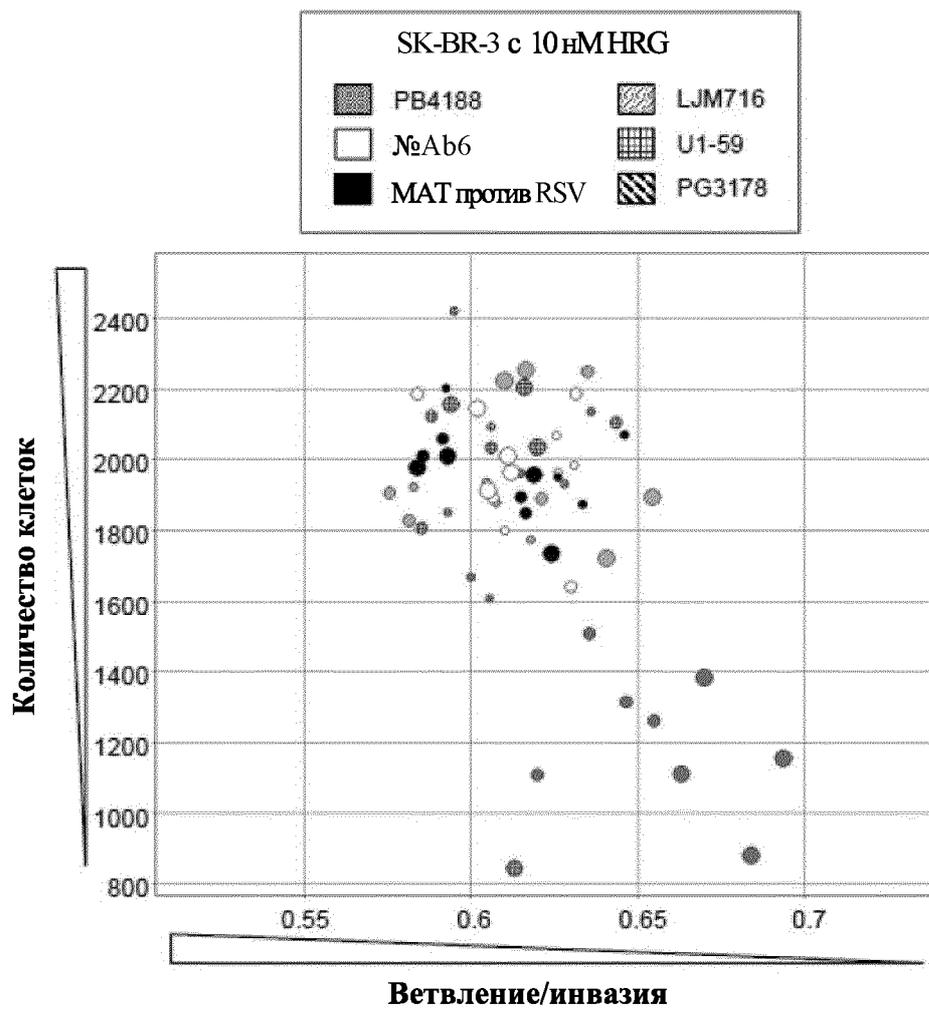


Фигура 9, продолжение

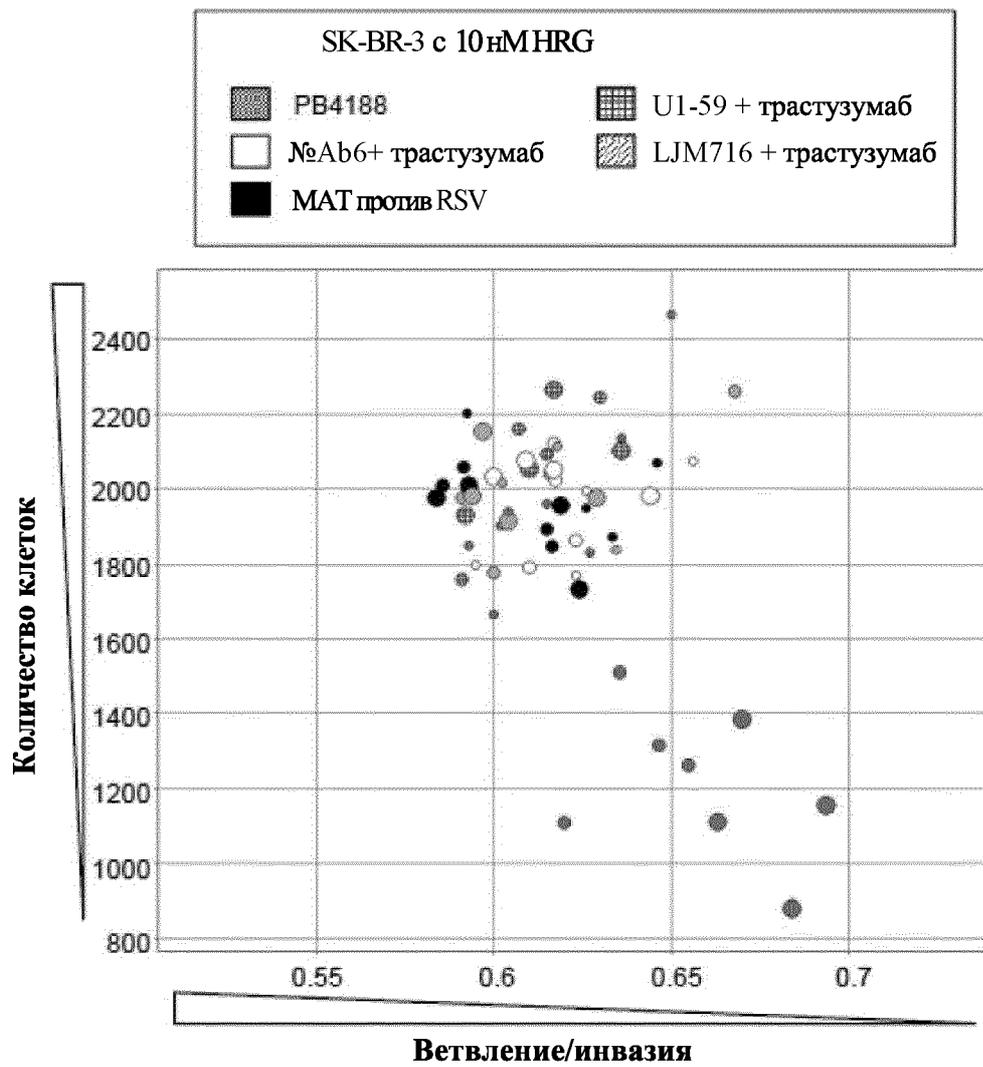


Фигура 10А



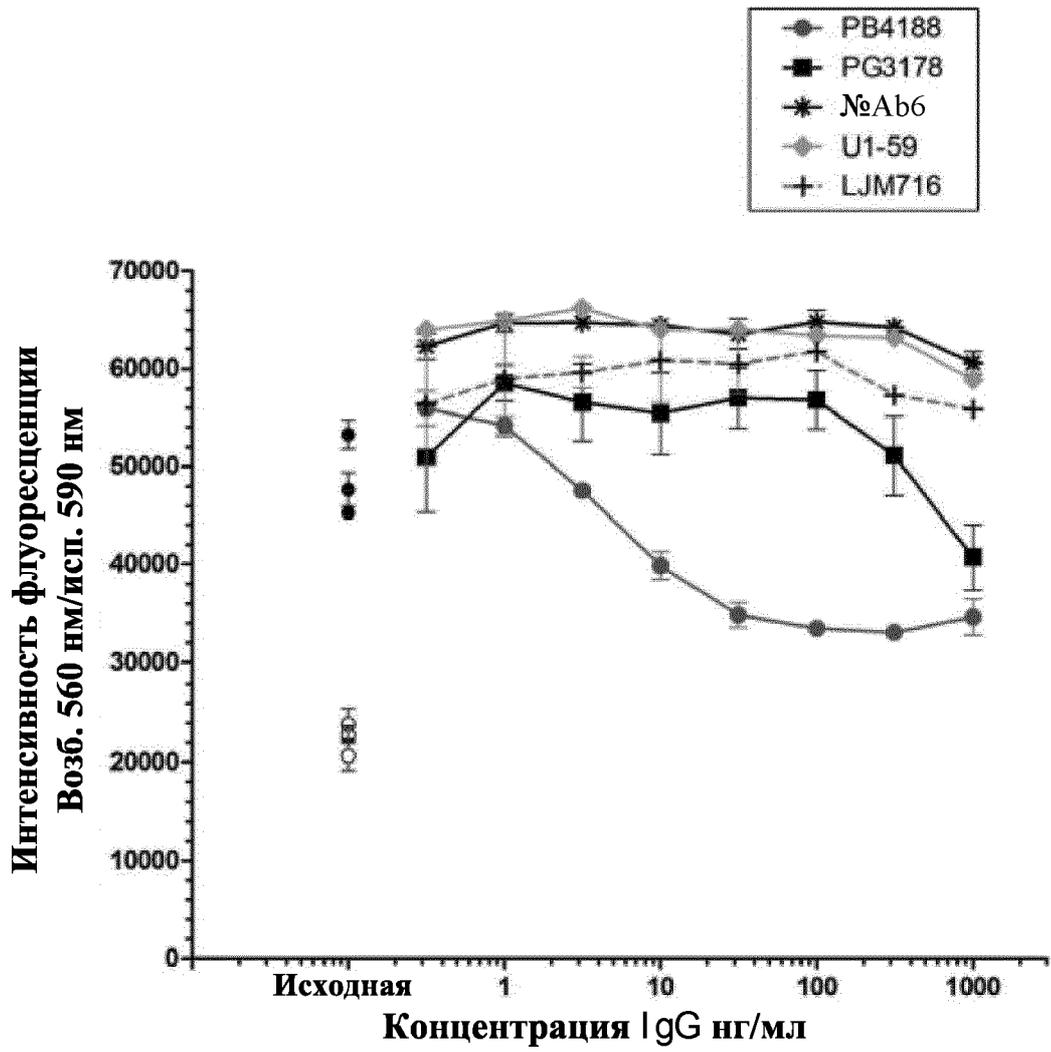


Фигура 10С

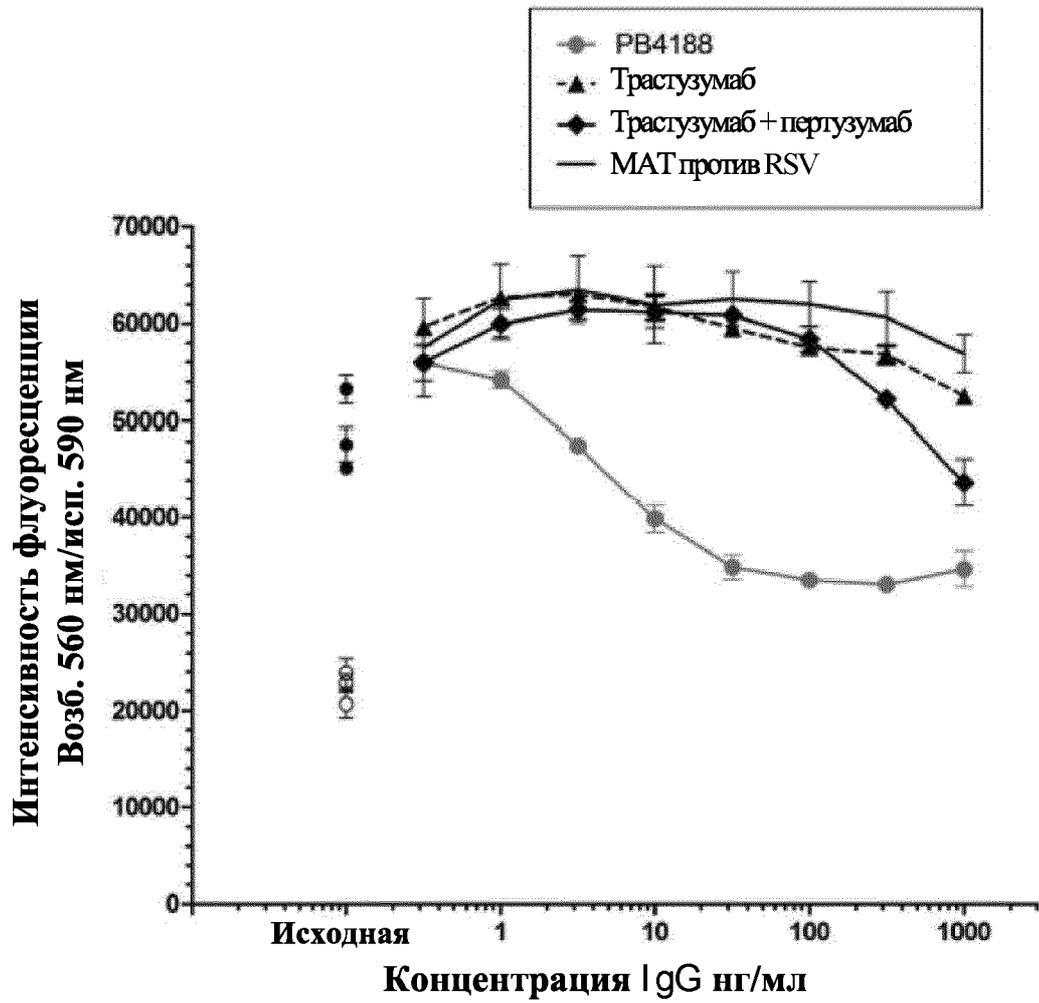


Фигура 10D

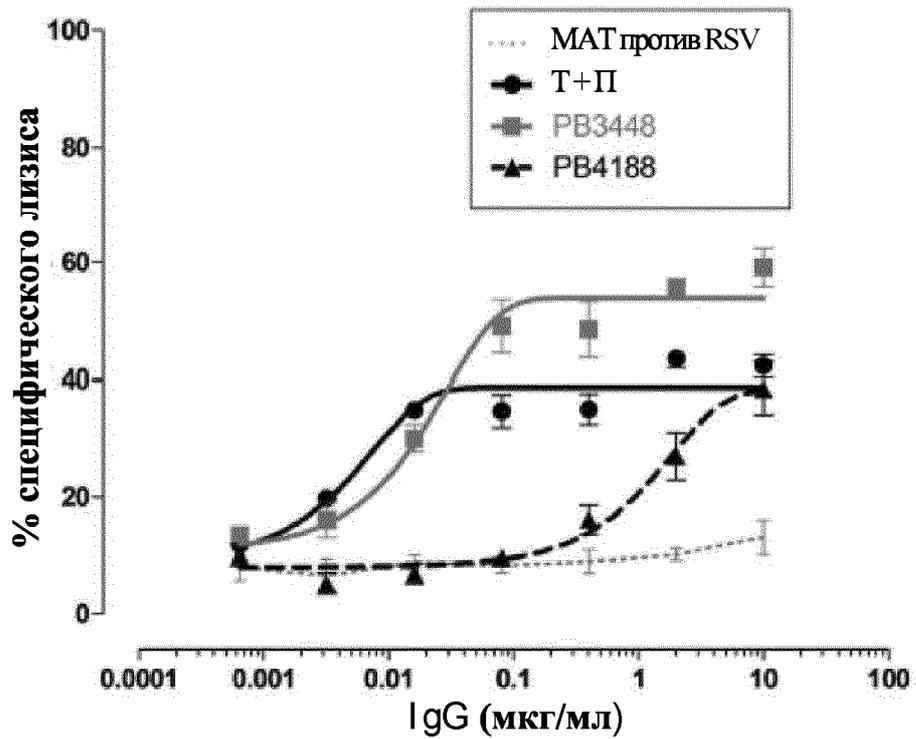
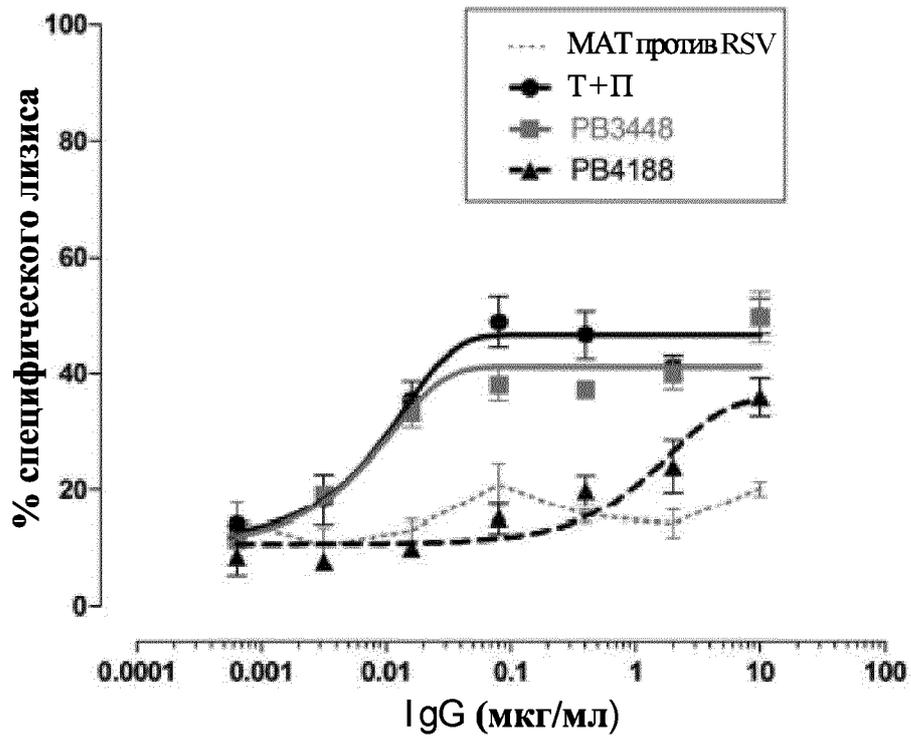




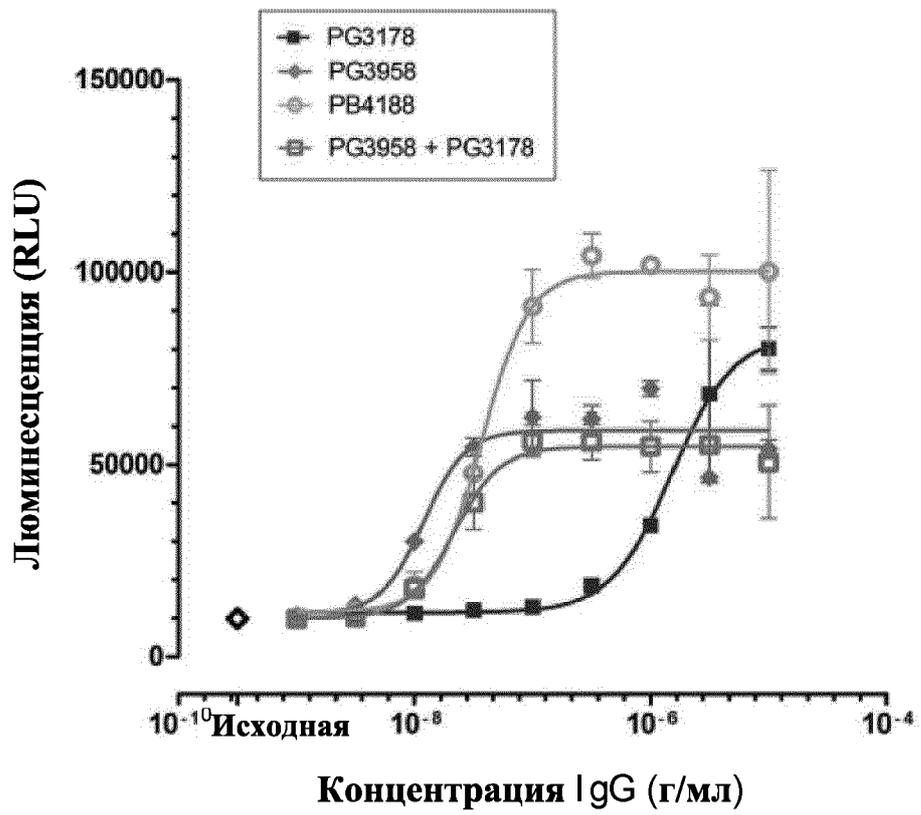
Фигура 11



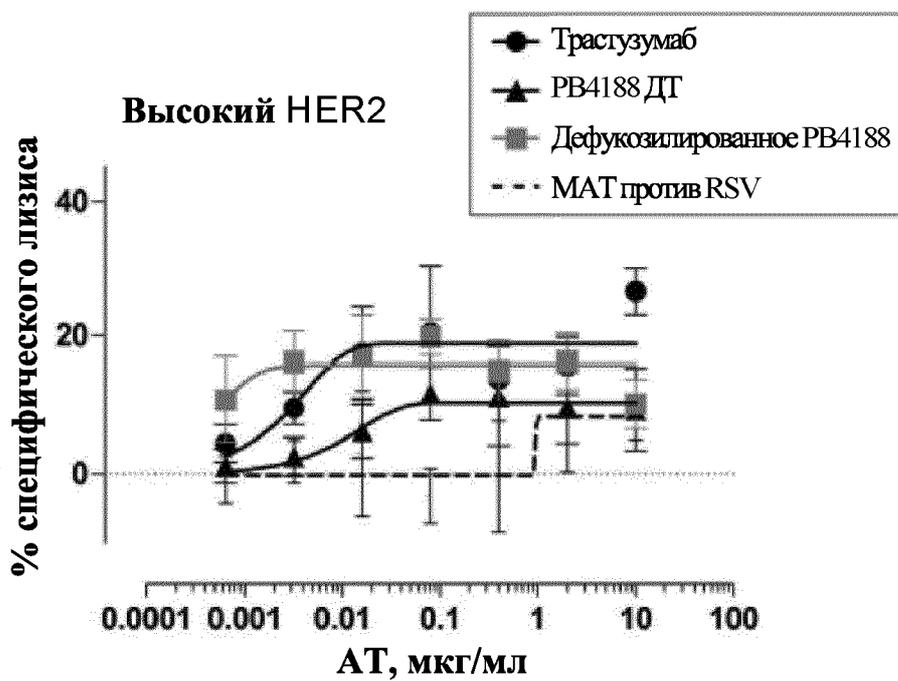
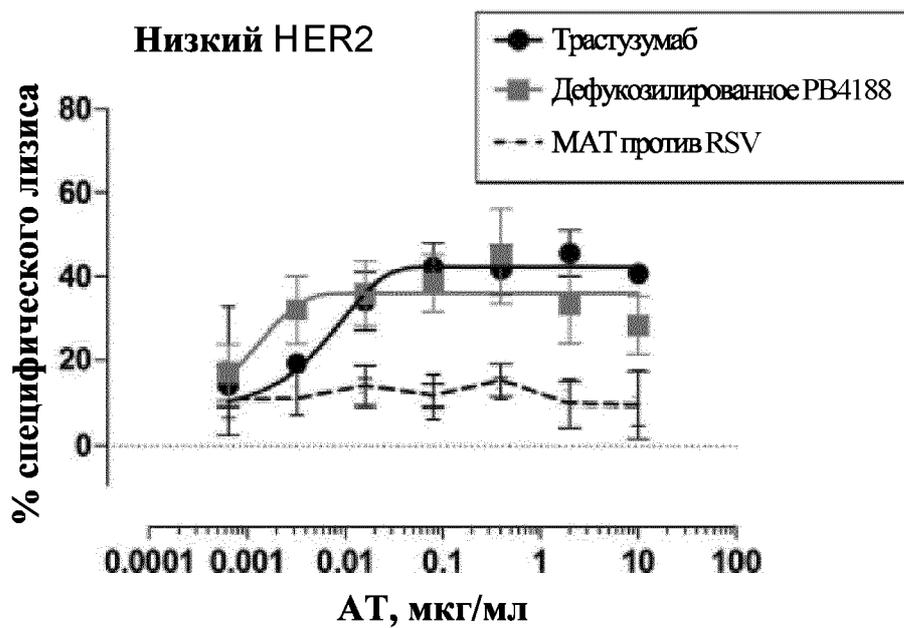
Фигура 11, продолжение



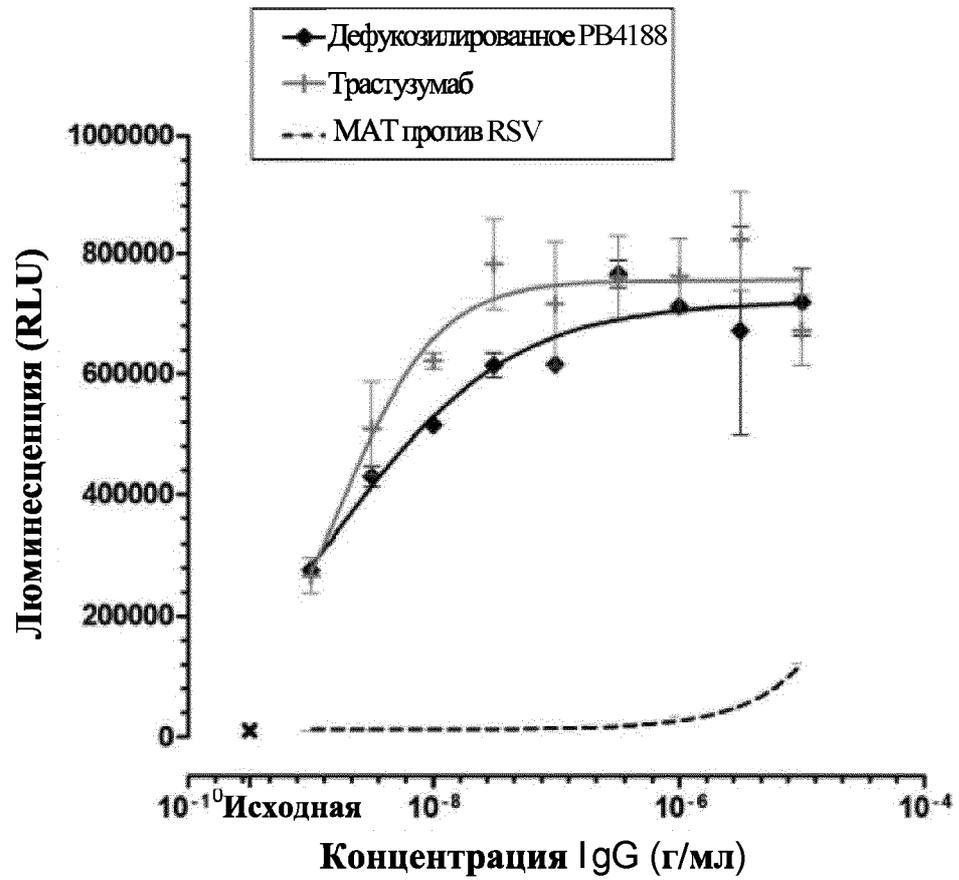
Фигура 12

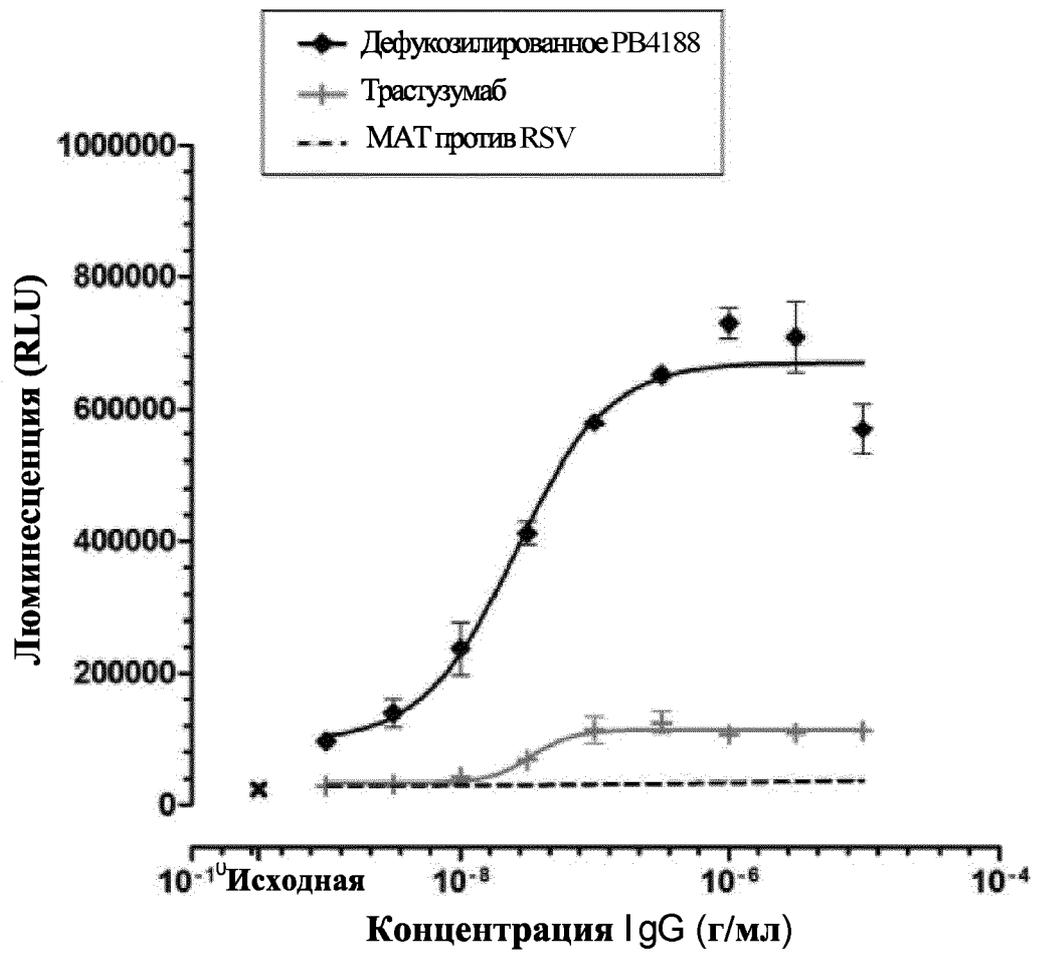


Фигура 13



Фигура 14

**Вариант FcγR с высокой аффинностью (V158)****Фигура 15**

**Вариант FcγR с низкой аффинностью (F158)****Фигура 15, продолжение**

## Фигура 16А

MF2926: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTCAAACC
61  TGGGGCTTCA GTGATGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG GCTACCACAT
121 GAACTGGGTG AAGCAAAGTC CTGAAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGAGACA TAAATCCTAG
181 CATTGGTACG ACTGCCACACA ACCAGATTTT CAGGGCCAAG GCCACAATGA CTGTTGACAA
241 ATCCTCCAAC ACAGCCTACA TGCAGCTCAA GAGCCTGACA TCTGAAGACT CTGGAGTCTT
301 TTA CTGTGTT AGAAGAGGGG ACTGGTCCTT CGATGTCTGG GGCACAGGGA CCACGGTCAC
361 CGTCTCCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLQQSGPELVKPGASVMISCKASGYSFTGYHMNWVKQSPEKSLEWIGDINPSIGT
TAHNQIFRAKATMTVDKSSNTAYMQLKSLTSEDSGVFYCVRRGDWSFDVWGTGTTV
TVSS
```

CDR1: GYHMNWVKQSPEKSLE

CDR2: NQIFRA

CDR3: RGDWSFDV

## Фигура 16А, продолжение

MF2930: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAAC TGGTGAAGCC
61  TGGAGCCTCA GTGATGATGT CCTGTAAGGT TTCTGGCTAC ACCTTCACTT CCTATCCTAT
121 AGCGTGGATG AAGCAGGTTT ATGGAAAGAG CCTAGAGTGG ATTGGAAATT TTCATCCTTA
181 CAGTGATGAT ACTAAGTACA ATGAAAACCT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGAAAA
241 ATCCTCTAGC ACAGTCTACT TGGAGCTCAG CCGATTAACA TCTGATGACT CTGCTGTTTA
301 TTA CTGTGCA AGAAGTAACC CATTATATTA CTTTGCTATG GACTACTGGG GTCAAGGAAC
361 CTCGGTCACC GTCTCCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
EVQLQQSGAELVKPGASVMMSCKVSGYTFTSYPIAWMKQVHGKSLEWIGNFHPYSD
DTKYNENFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLTSDDSAVYYCARSNPLYYFAMDYWGQG
TSVTVSS
```

CDR1: SYPIAWMKQVHGKSLE

CDR2: NENFKG

CDR3: SNPLYYFAMDY

## Фигура 16А, продолжение

MF1849: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATT CACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AAAGGTGACT ACGTTCTTA CTCTTCTTAC GCCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYAFDYWG
QGTLVTVSS
```

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GDYGSYSSYAFDY

## Фигура 16А, продолжение

MF2973: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGTTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ATTTTCACTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGTTG AGGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAATGG ATTGCAAAAA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTAAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGGCCCC ACTATGATTA CGACGGCCCC TGGTTTGTTC ACTGGGGCCA
361 AGGGACTCTG GTCACCGTCT CCACT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTGYYINWLRQRPQGQLEWIAKIYPGSGNT
YYNEKFRGKATLTAEESSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGPHYDYDGPWFVYWGQ
GTLVTVSS
```

CDR1: GYYINWLRQRPQGQLE

CDR2: NEKFRG

CDR3: GPHYDYDGPWFVY

## Фигура 16А, продолжение

MF3004: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCCTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCCCACT ATGGTTACGA CGACTGGTAC TTCGGTGTCT GGGGCACAGG
361 CACCACGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGY
TYYNEKFKGKATLTAEESSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGT
GTTVTVSS
```

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

## Фигура 16А, продолжение

MF2971: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAACTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACTG CCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGCTAT ACTTACTACA ATGAGATTTT CAAGGGCAGG GCCACACTGA CTGCAGACGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAACTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCTCCGG TCTACTATGA CTCGGCCTGG TTTGCTTACT GGGGCCAAGG
361 GACTCTGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPSGY
TYYNEIFKGRATLTADESSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG
TLVTVSS
```

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEIFKG

CDR3: PPVYYDSAWFAY

## Фигура 16А, продолжение

MF3025: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGACTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAAC ACTGCCTATA TGCACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGGCCCACT ATGGTTACGA CGACTGGTAC TTCGCTGTCT GGGGCACAGG
361 GACCACGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLKQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGY
TYYNEKFKGKATLTAEESNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFAVWGT
GTTVTVSS
```

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFAV

## Фигура 16А, продолжение

MF2916: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 CAGTGGTCAT ACTTCCTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTACAGAAAA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCTATCT ACTTTGATTA CGCAGGGGGG TACTTCGATG TCTGGGGCAC
361 AAGAACCTCG GTCACCGTCT CCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPSGH
TSYNEKFKGKATLTTEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPIYFDYAGGYFDVWGTR
TSVTVSS
```

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PIYFDYAGGYFDV

## Фигура 16А, продолжение

MF3958: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGCGCCGAAG TGAAGAAACC
61  TGGCGCCAGC GTGAAGCTGA GCTGCAAGGC CAGCGGCTAC ACCTTCACCG CCTACTACAT
121 CAACTGGGTC CGACAGGCC CAGGCCAGGG CCTGGAATGG ATCGGCAGAA TCTACCCCGG
181 CTCCGGCTAC ACCAGCTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCAGA GCCACCCTGA CCGCCGACGA
241 GAGCACCAGC ACCGCCTACA TGGAAGTGA GAGCCTGCGG AGCGAGGATA CCGCCGTGTA
301 CTTCTGCGCC AGACCCCCCG TGTACTACGA CAGCGCTTGG TTTGCCTACT GGGGCCAGGG
361 CACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPSGSY
TSYAQKFQGRATLTADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG
TLVTVSS
```

CDR1: AYYIN

CDR2: RIYPSGSYTSYAQKFQG

CDR3: PPVYYDSAWFAY

## Фигура 16А, продолжение

MF3031: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCCTG CCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAAGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAATTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGT ACTGCCTACA TACAACTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGCGTCT ATGATTACGA CGGGGCCTGG TTTGCTTACT GGGGCCAAGG
361 GACTCTGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIAKIYPGSGY
TYYNENFRGKATLTAEESSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARGVYDYDGAWFAFWGQG
TLVTVSS
```

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NENFRG

CDR3: GVDYDGAWFAW

## Фигура 16А, продолжение

MF3991: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGCGCCGAAG TGAAGAAACC
61  TGGCGCCAGC GTGAAGCTGA GCTGCAAGGC CAGCGGCTAC ACCTTCACCG CCTACTACAT
121  CAACTGGGTC CGACAGGCC CAGGCCAGGG CCTGGAATGG ATCGGCAGAA TCTACCCCGG
181  CTCCGGCTAC ACCAGCTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCAGA GCCACCCTGA CCGCCGACGA
241  GAGCACCAGC ACCGCCTACA TGGAAGTGA GAGCCTGCGG AGCGAGGATA CCGCCGTGTA
301  CTTCTGCGCC AGACCCCACT ACGGCTACGA CGACTGGTAC TTCGGCGTGT GGGGCCAGGG
361  CACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGY
TSYAQKFQGRATLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGQ
GTLVTVSS
```

CDR1: AYYIN

CDR2: RIYPGSGYTSYAQKFQG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

## Фигура 16В

MF3178: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAACTATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Последовательность аминокислот:

```

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGF
DYWGQGTLVTVSS

```

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

## Фигура 16В, продолжение

MF3176: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTGCAGCT GTTGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTACAGCC
61  TGGGGGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACCTTTAGCA GCTATGCCAT
121 GAGCTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGGAAGGG GCTGGAGTGG GTCTCAGCTA TTAGTGGTAG
181 TGGTGGTAGC ACATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGCCGG TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCCGAGGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATTGGT GGTACCCGCC G TACTACTGG GGCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWWYPPYYWGFDYWG
QGTLVTVSS
```

CDR1: SYAMS

CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG

CDR3: DWWYPPYYWGFDY

## Фигура 16В, продолжение

MF3163: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAACTATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AAAGATTCTT ACTCTCGTCA TTTCTACTCT TGGTGGGCCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Последовательность аминокислот:

```

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVVYYCAKDSYSRHFYSWWAF
DYWGQGTLVTVSS

```

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DSYSRHFYSWWAFDY

## Фигура 16В, продолжение

MF3099: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGCCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGACTTCA GTGAAGTTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACCTTCACCA GCTACTGGAT
121 GCACTGGGTA AAGCAGAGGC CTGGACAAGG CCTTGAGTGG ATCGGAATTC TTGATCCTTC
181 TGATAGTTAT ACTACCTACA ATCAAAAGTT CAAGGGCAAG GCCACATTAА CAGTAGACAC
241 ATCCTCCAGC ATAGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGCTCTA
301 TTA CTGTGCA AGAGGGGAG ATTACGACGA GGGAGGTGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
361 AACCTCGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
EVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGILDPSDSY
TTYNQKFKGKATLTVDTSSSIAYMQLSSLTSEDSALYYCARGGDYDEGGAMDYWGQ
GTSVTVSS
```

CDR1: SYWMH

CDR2: ILDPDSYTTYNQKFKG

CDR3: GGDYDEGGAMDY

## Фигура 16В, продолжение

MF3307: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAACTATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGTTCTC GTAAACGTCT GTCTAACTAC TTCAACGCCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Последовательность аминокислот:

```

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARGSRKRLSNYFNAFD
YWGQGLVTVSS

```

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: GSRKRLSNYFNAFDY

## Фигура 16С

а) Общая легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## Фигура 16D

тяжелая цепь для связывания erbB-2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGY  
TSYAQKFQGRATLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

тяжелая цепь для связывания erbB-3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNS  
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWG  
DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

## Фигура 16Е

### Последовательности специфических к HER2 антител

MF2889: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGAGCTGAGC TGGTAAGGCC
61  TGGGACTTCA GTGAAGGTGT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC GCCTTCACTA ATTATTTGAT
121 AGAGTGGGTA AAGCAGAGGC CTGGCCAGGG CCTTGAGTGG ATTGGAGTGA TTTATCCTGA
181 AGGTGGTGGT ACTATCTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCAACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CGGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGAGACT ATGATTACAA ATATGCTATG GACTACTGGG GTCAAGGAAC
361 CTCGGTCACC GTCTCCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
EVQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKASGYAFTNYLIEWVKQRPQG LEWIGVIYPEGGG
TIYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARGDYDYKYAMDYWGQG
TSVTVSS
```

CDR1: NYLIE

CDR2: VIYPEGGGTIYNEKFKG

CDR3: GDYDYKYAMDY

## Фигура 16Е, продолжение

MF2913: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCAAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61  TGGCGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG ACTACAAAAT
121 GGACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTCGAATGG ATTGGAATA TTAATCCTAA
181 CAGTGGTGGT GTTATCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG GTCACATTGA CTGTTGACAG
241 GTCCTCCAGC GCAGCCTACA TGGAGCTCCG CAGCCTGACA TCTGAGGACA CTGCAGTCTA
301 TTATTGTTCA AGAGGACTGT GGGATGCTAT GGA CTCTCTGG GGTCAAGGAA CCTCGGTCAC
361 CGTCTCCAGT
  
```

Последовательность аминокислот:

```

EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYKMDWVKQSHGKSLEWIGNINPNSSG
VIYNQKFRGKVTTLTVDRSSSAAYMELRSLTSEDVAVYYCSRGLWDAMDSWGQGTSVT
VSS
  
```

CDR1: DYKMDWVKQSHGKSLE

CDR2: NQKFRG

CDR3: GLWDAMDS

## Фигура 16Е, продолжение

MF1847: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AAAGTTGGT GGCATCCGCT GCTGTCTGGC TTTGATTATT GGGGCCAAGG
361 TACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWWHPLLSGFDYWG
QGTLVTVSS
```

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GWWHPLLSGFDY

## Фигура 16Е, продолжение

MF3001: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAAC TGGCAAAACC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGAC TTCTGGCTAC AACTTTCCTA TCTACTGGAT
121 GCACTGGGTA AAACAGAGGC CTGGACGGGG TCTGGAATGG ATTGGATACA TTAATCCTAG
181 TACTGGTTAT ATTAAGAACA ATCAGAAGTT CAAGGACAAG GCCACCTTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAAC ACAGCCTACA TGCAGCTGAA CAGCCTGACA TATGAGGACT CTGCAGTCTA
301 TTA CTGTACA AGAGAAGGGA TAACTGGTT TACTTACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC
361 CGTCTCCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
EVQLQQSGAELAKPGASVKLSCKTSGYNFPIYWMHWVKQRPGRGLEWIGYINPSTGY
IKNNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLNSLTYESDAVYYCTREGITGFTYWGQGLVT
VSS
```

CDR1: IYWMHWVKQRPGRGLE

CDR2: NQKFKD

CDR3: EGITGFTY

## Фигура 16Е, продолжение

MF 1898: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AAAGATGGTT TCCGTCGTAC TACTCTGTCT GGCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCA GT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGFRRTTLSGFDYW
GQGLVTVSS
```

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: DGFRRTTLSGFDY

## Фигура 16Е, продолжение

MF3003 последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGCGAC GCATTCAGTT ACTCCTGGAT
121 GAAC TGGGTG AAGCAGAGGC CTGGAAAGGG TCTTGAGTGG ATTGGACGGA TTTATCCTGG
181 AGATGGAGAT ATTAАСТАСА ATGGGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACAGCCCACC TGCAACTCAA CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 CTTCTGTGCA AGAGGACAGC TCGGACTAGA GGCCTGGTTT GCTTATTGGG GCCAGGGGAC
361 TCTGGTCACC GTCTCCAGT
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGDAFSYSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDG
DINYNGKFKGKATLTADKSSSTAHLQLNSLTSEDSAVYFCARGQLGLEAWFAYWGQ
GTLVTVSS
```

CDR1: YSWMNWVKQRPKGLE

CDR2: NGKFKG

CDR3: QLGLEAWFAY

## Фигура 16Е, продолжение

### Последовательности специфических к HER3 антител

MF6058: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGACG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCA CGTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGC TCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 AAGTGGTGGC ACAAACTATG CAAAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCTCTATGA CCAGGGAGAC
241 GTCCACAAGC ACAGCCTACA TGCAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTACGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Последовательность аминокислот:

```

QVQLVQSGADVKKPGASVKVTCKASGYTFTGYMHVWRQAPGQALEWMGWINPQS
GGTNYAKKFQGRVSMRETSTSTAYMQLSRLRSDDTATYYCARDHGSRHFWSYWGFDY
DYWGQGLVTVSS

```

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPQSGGTNYAKKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

## Фигура 16Е, продолжение

MF6061: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 GAGTGGTGGC ACAAАCTATG CACAGAAGTT TAAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCACCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTAАCTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPQS
GGTNYAQKFKGRVTMTRDTSTSTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGF
DYWGQGTLVTVSS
```

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPQSGGTNYAQKFKG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

## Фигура 16Е, продолжение

MF6065: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновых кислот (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```
1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCT CTTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 GGGGGTCT ACAAACTATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCACCAGC ACAGTGTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T
```

Последовательность аминокислот:

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPQG
GSTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSRLRSEDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDY
DYWGQGTLVTVSS
```

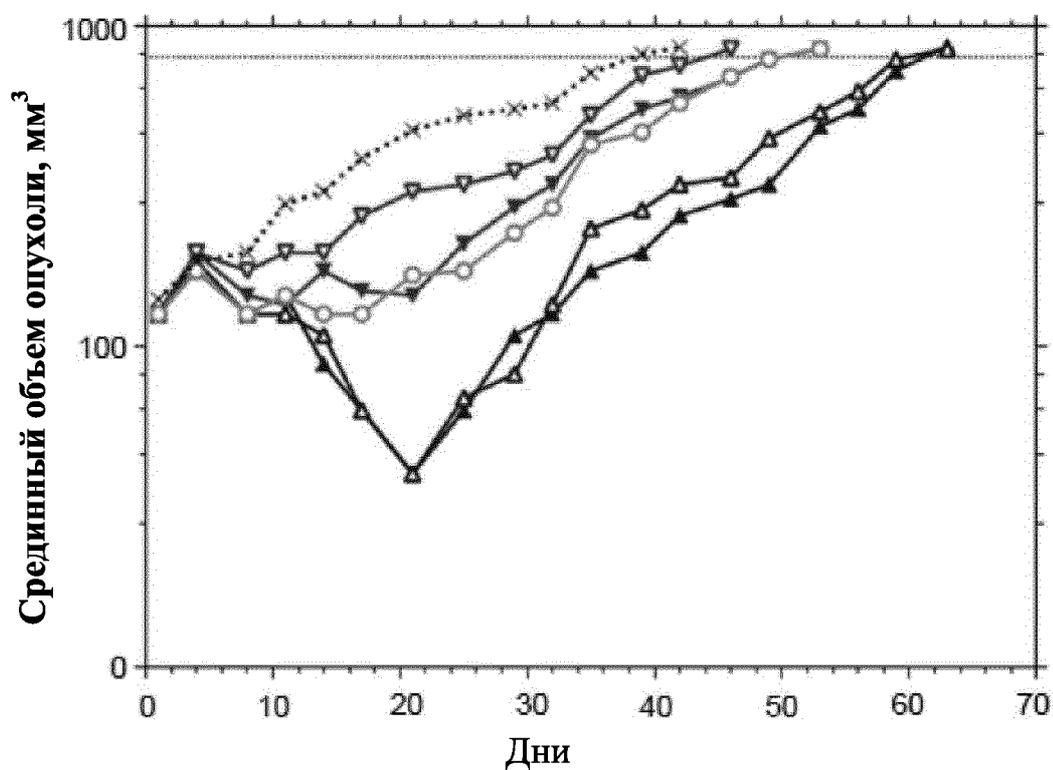
CDR1: SYMH

CDR2: WINPQGGSTNYAQKFQG

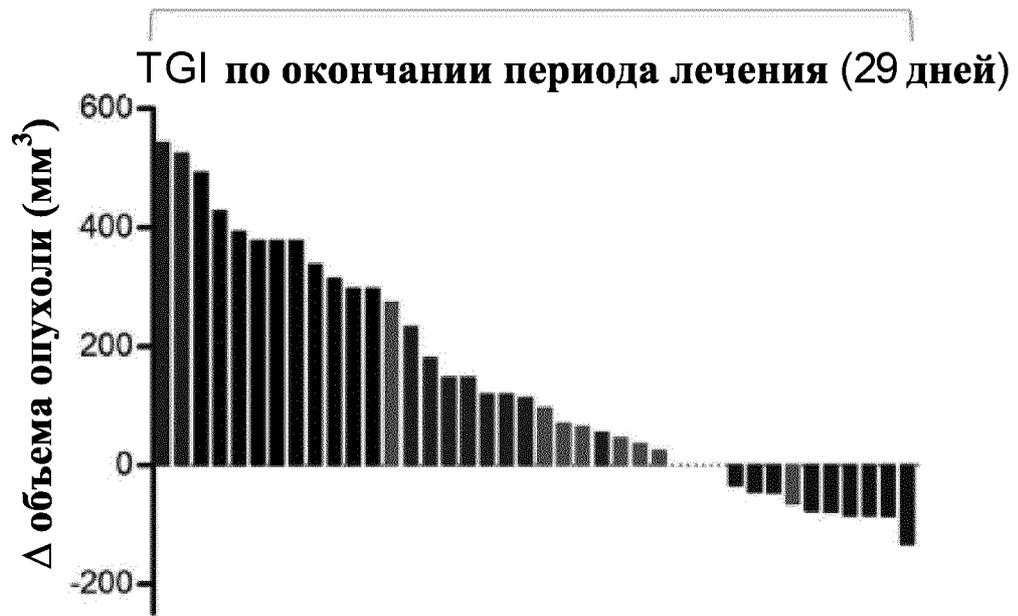
CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

- ×· G1: среда(-) и/п; раз в нед. x 4
- G2: лапатиниб (150) п/о; раз в день x 28
- △ G3: РВ4188р52(2,5) и/п; раз в нед. x 4
- ▲ G4: РВ4188р52(25) и/п; раз в нед. x 4
- ▽ G5: Пертузумаб-трастузумаб (смесь 1:1)(2,5)
- ◆ G6: Пертузумаб-трастузумаб (смесь 1:1)(25)

### Срединный рост опухоли в JIMT-1-e221



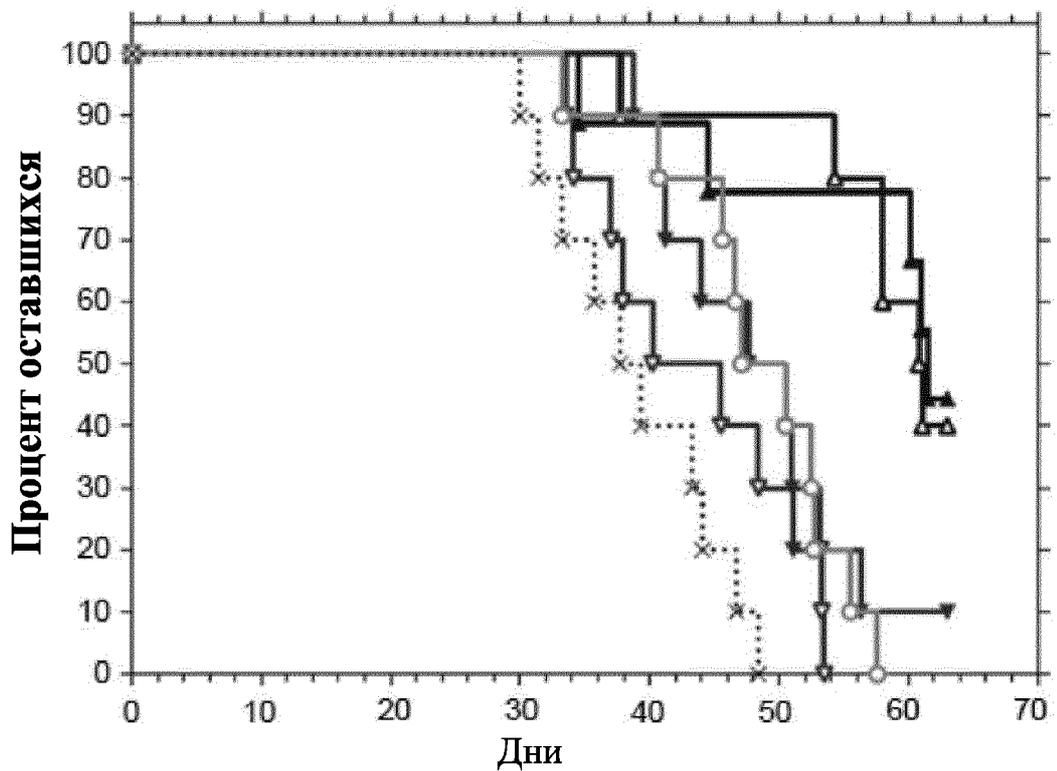
Фигура 17



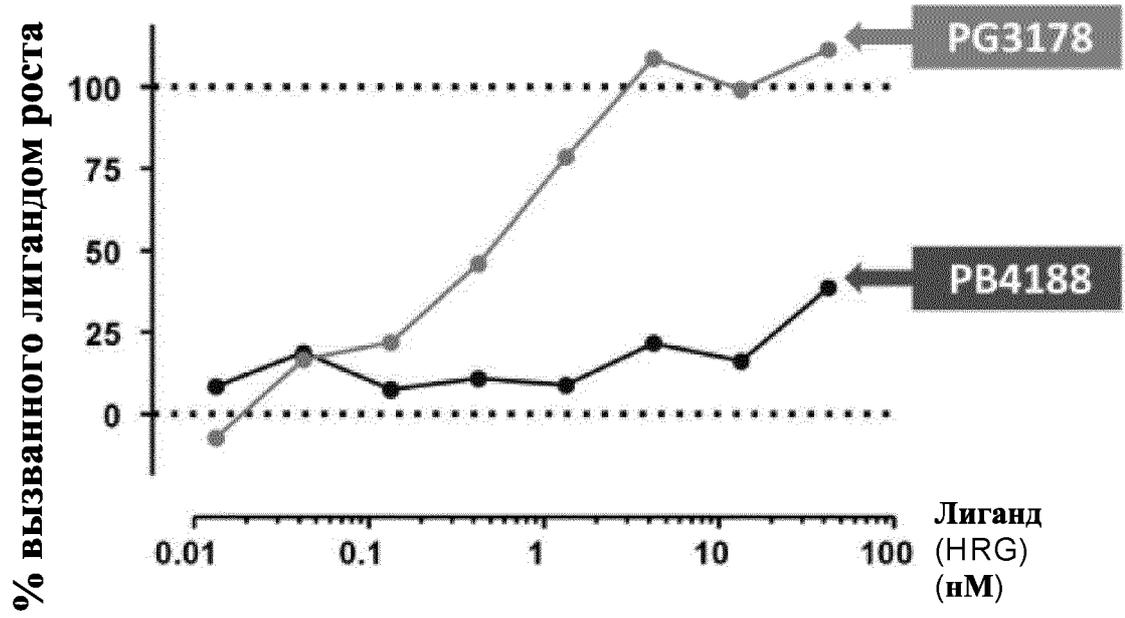
Фигура 17, продолжение

- x· G1: среда(-) и/п; раз в нед. x 4
- G2: лапатиниб (150) п/о; раз в день x 28
- △ G3: PB4188p52(2,5) и/п; раз в нед. x 4
- ▲ G4: PB4188p52(25) и/п; раз в нед. x 4
- ▽ G5: Пертузумаб-трастузумаб (смесь 1:1)(2,5)
- ◆ G6: Пертузумаб-трастузумаб (смесь 1:1)(25)

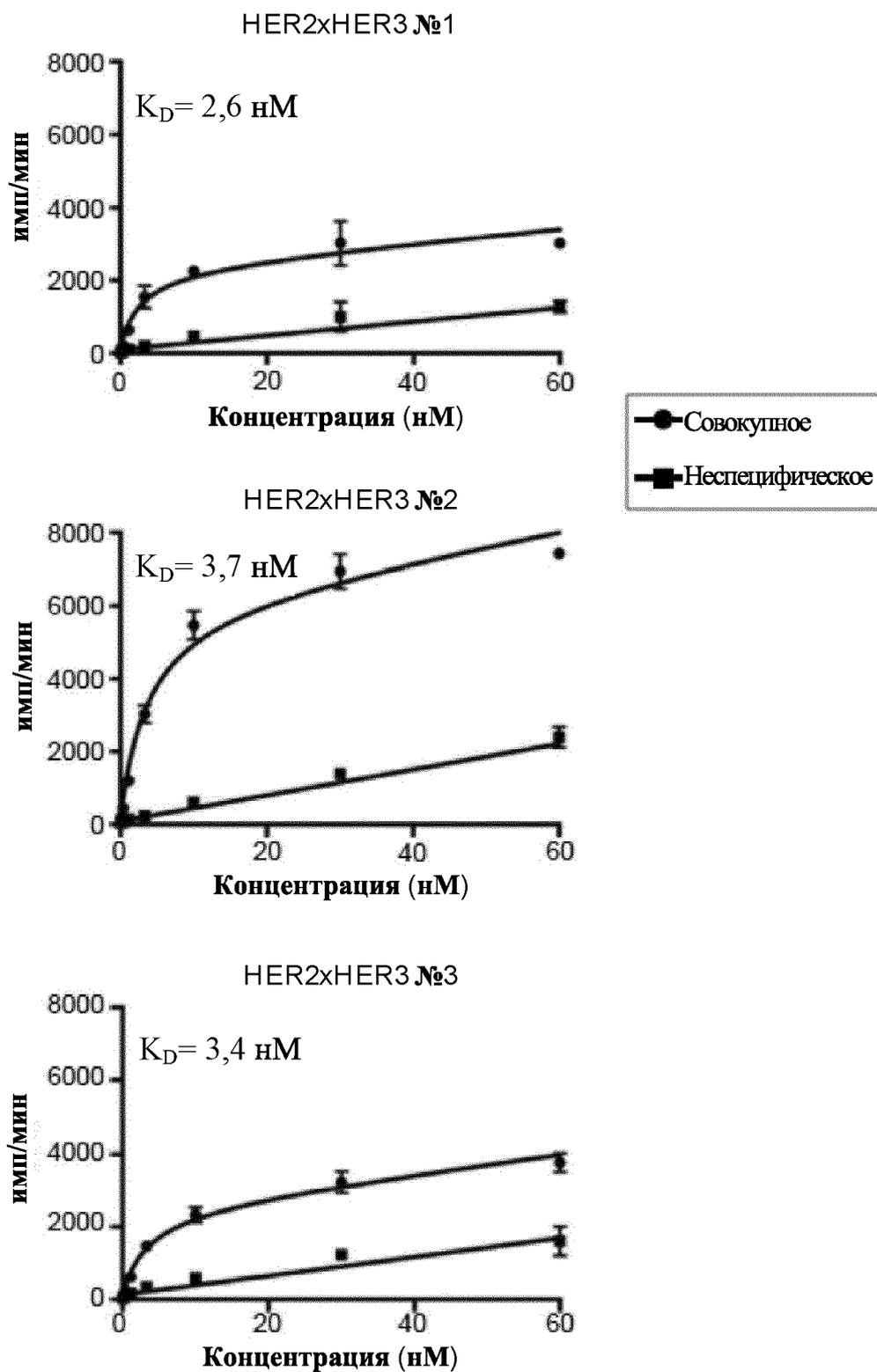
**График Каплана-Мейера для JIMT-1-e221**



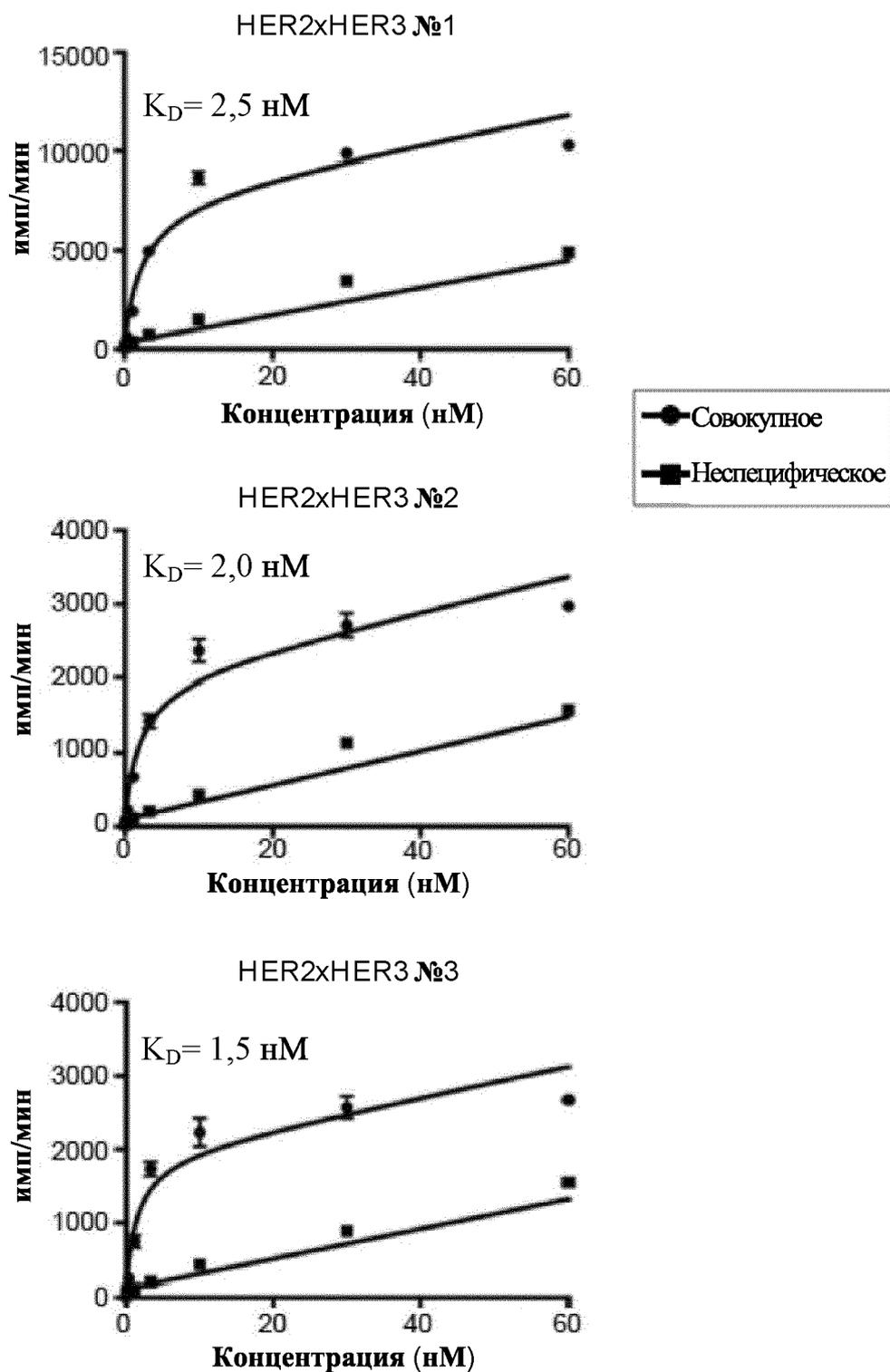
**Фигура 18**



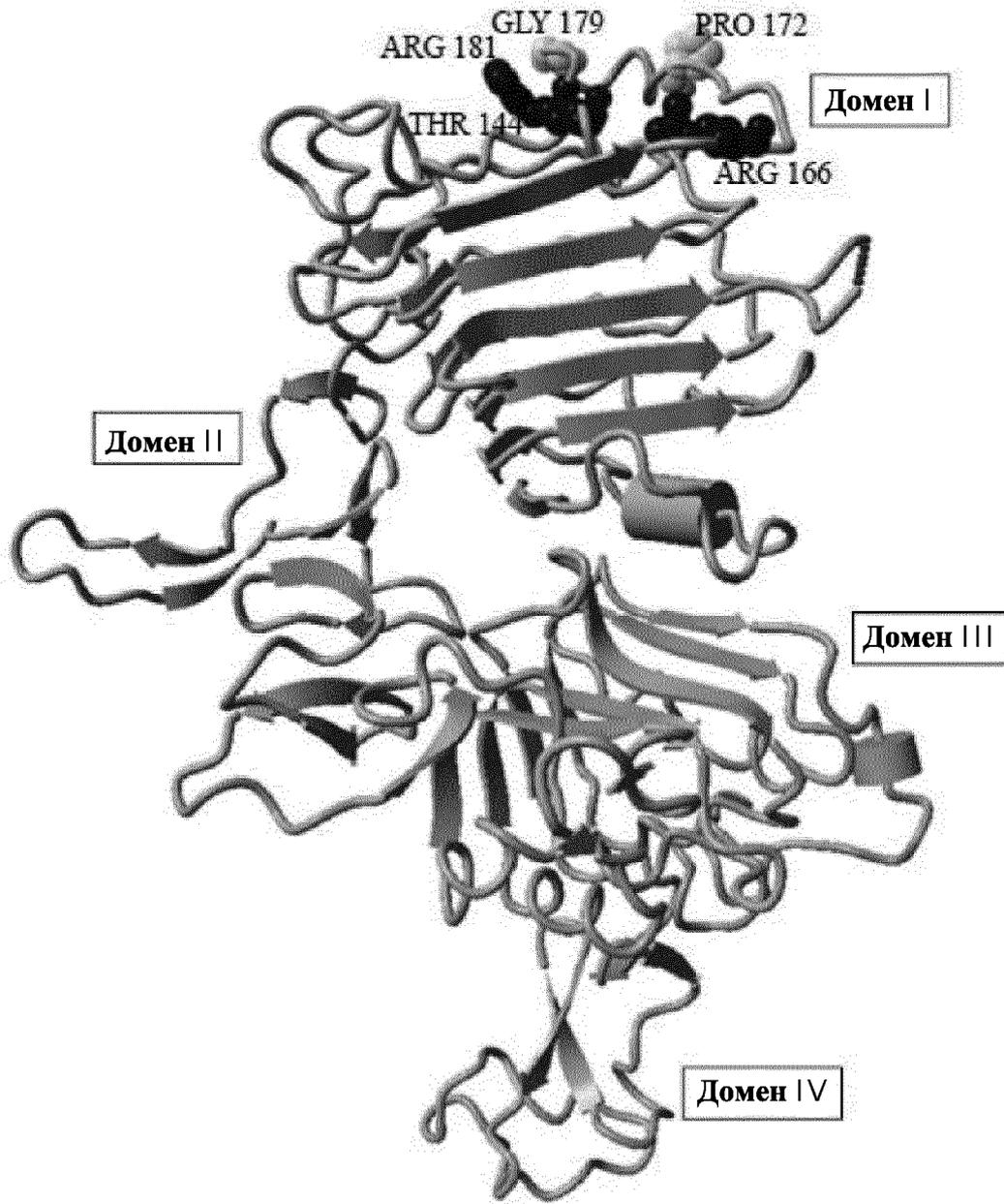
Фигура 19



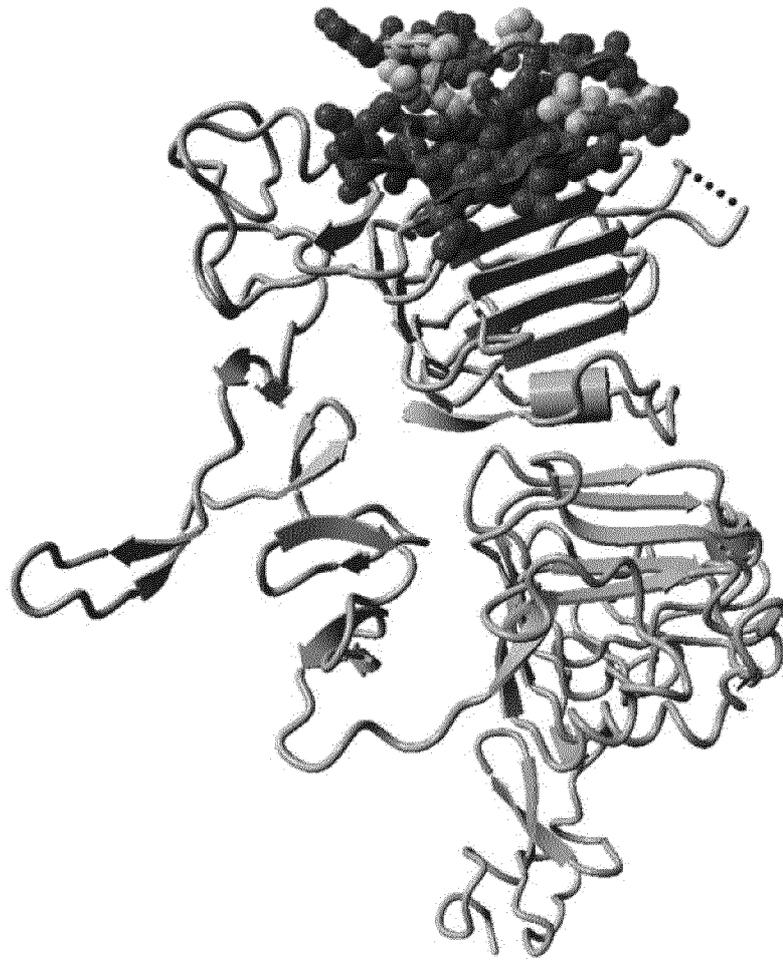
Фигура 20



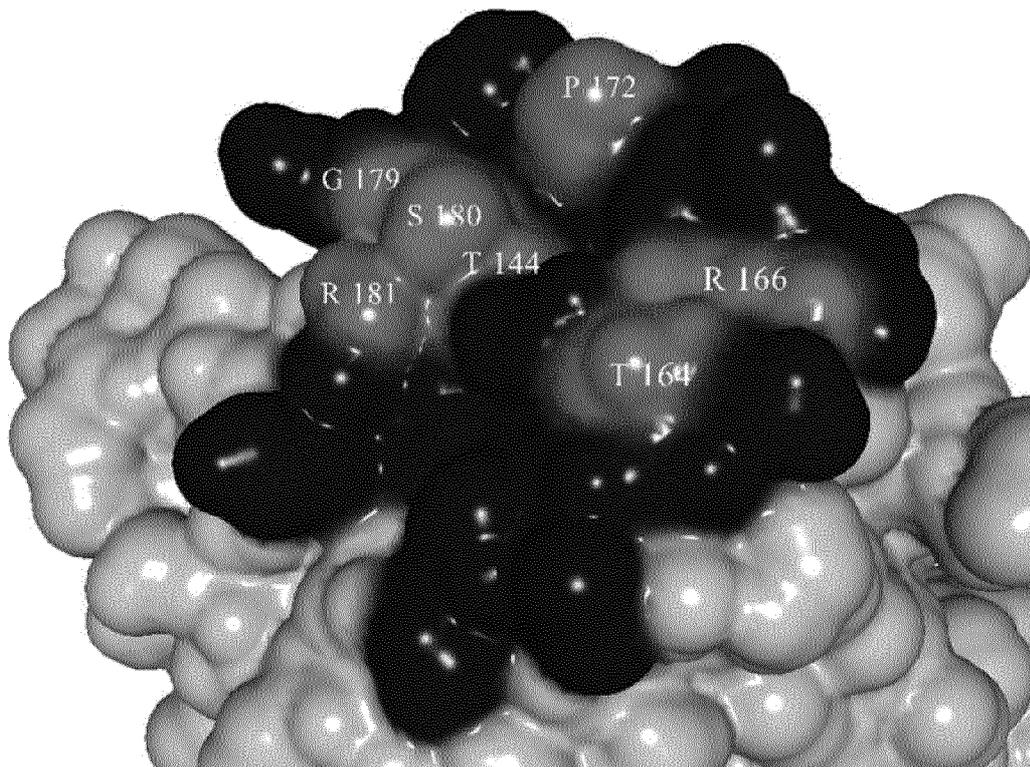
Фигура 20, продолжение



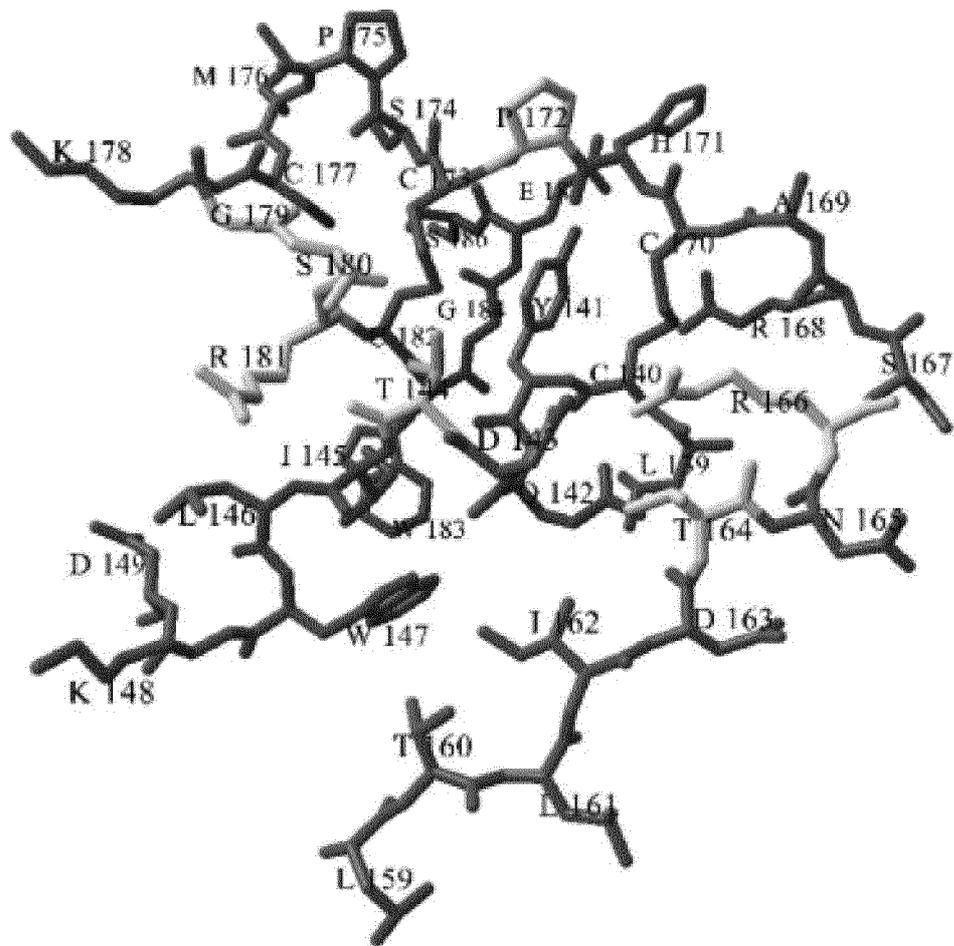
**Фигура 21А**



**Фигура 21В (а)**



**Фигура 21В (b)**



**Фигура 21В (с)**

139

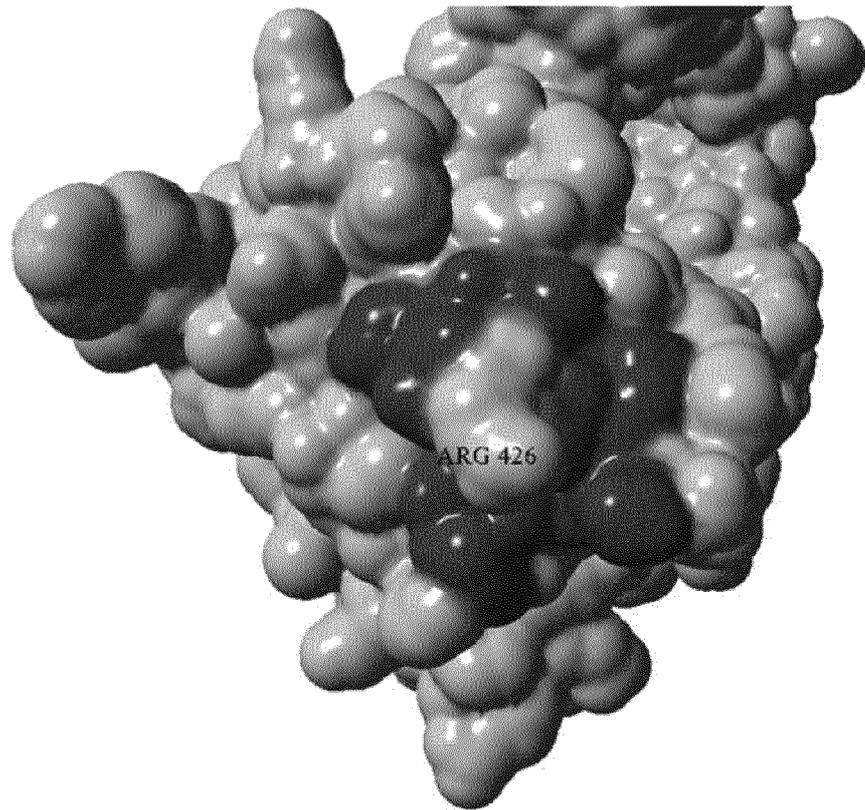
LCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGS

186

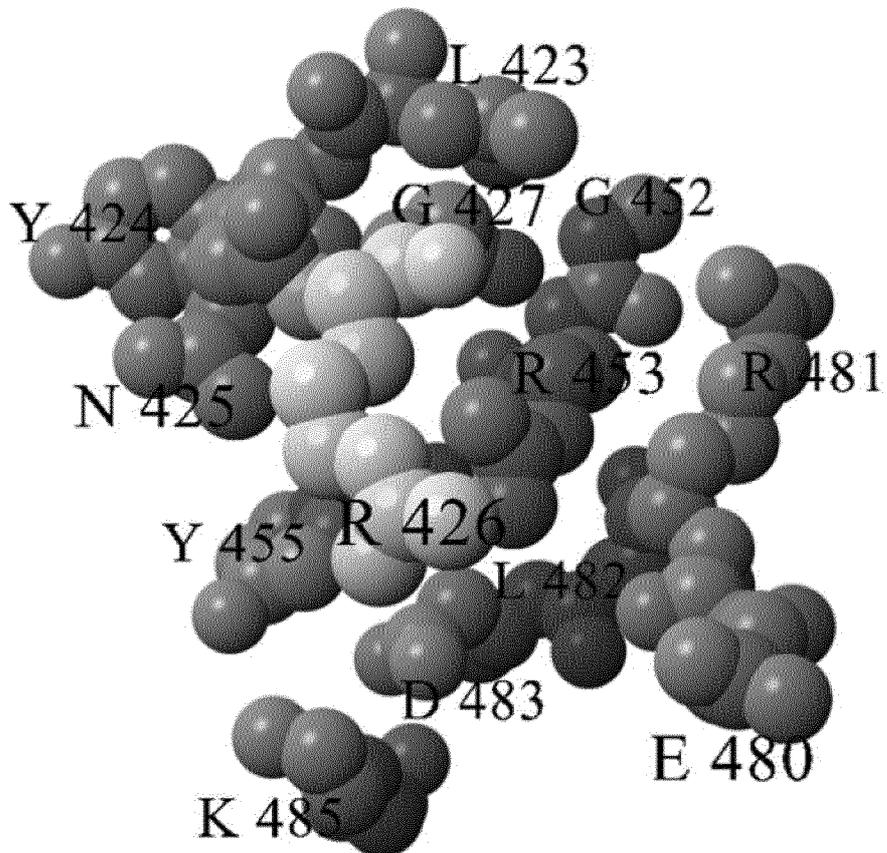
**Фигура 21В (d)**



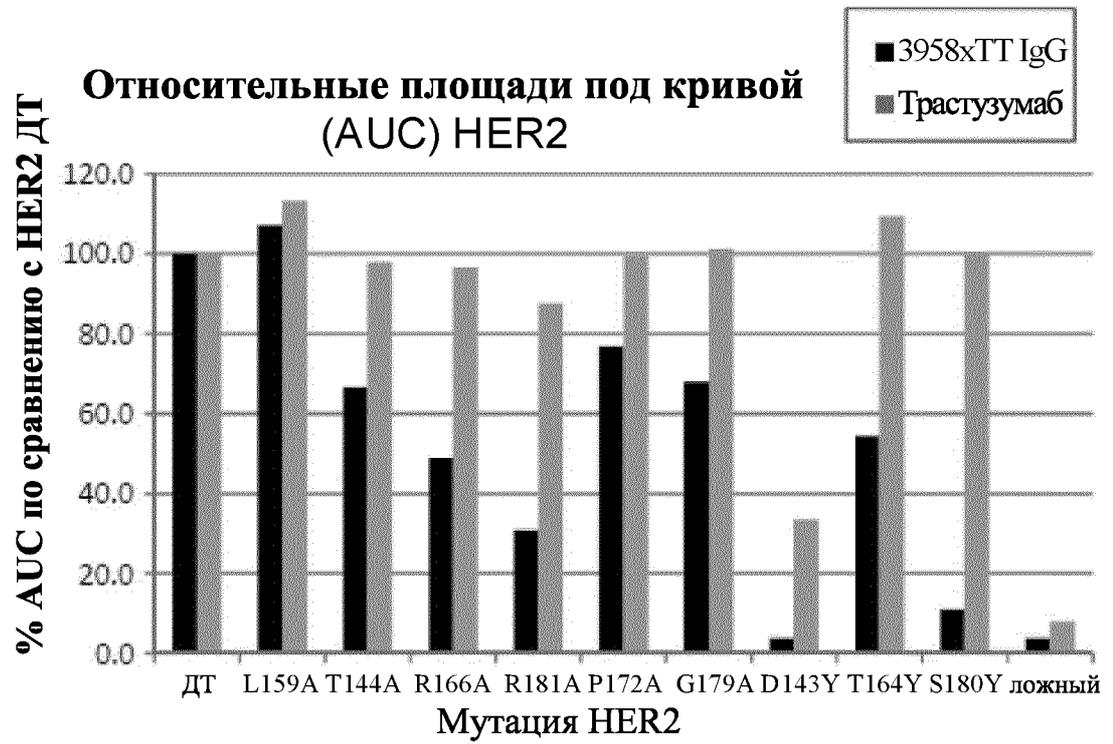
**Фигура 21С (а)**

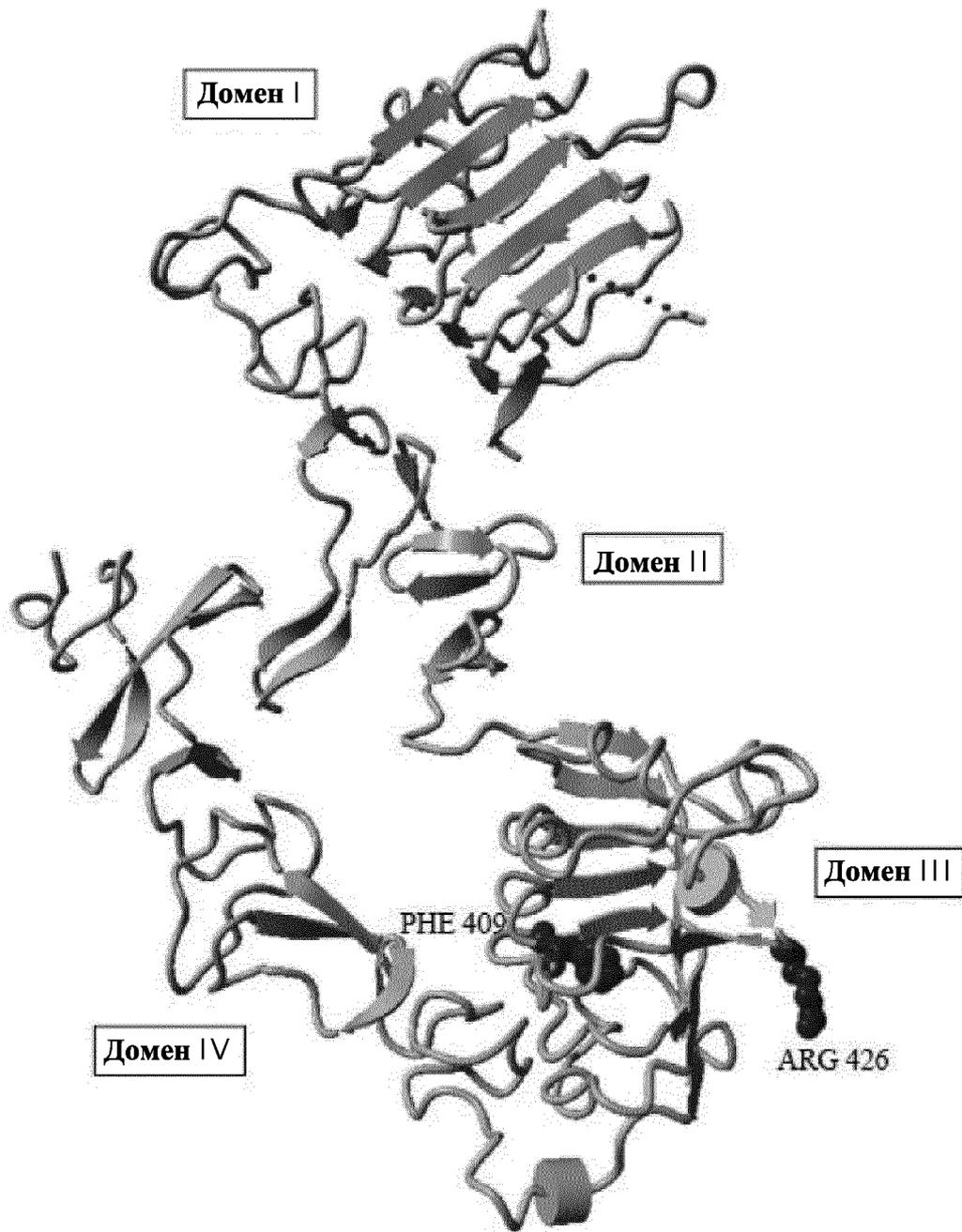


**Фигура 21С (b)**

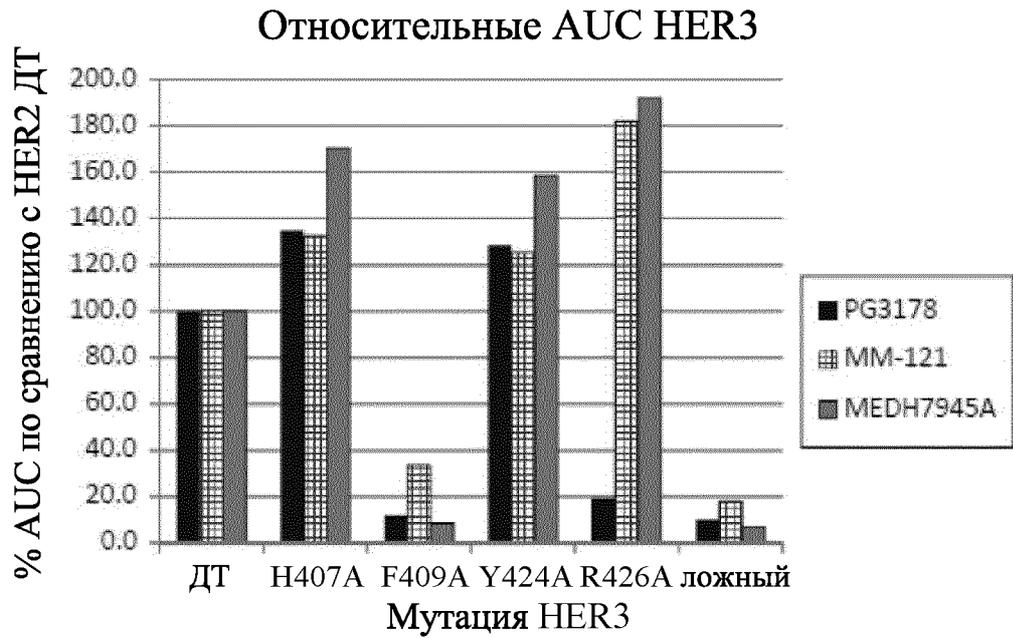


**Фигура 21С (c)**

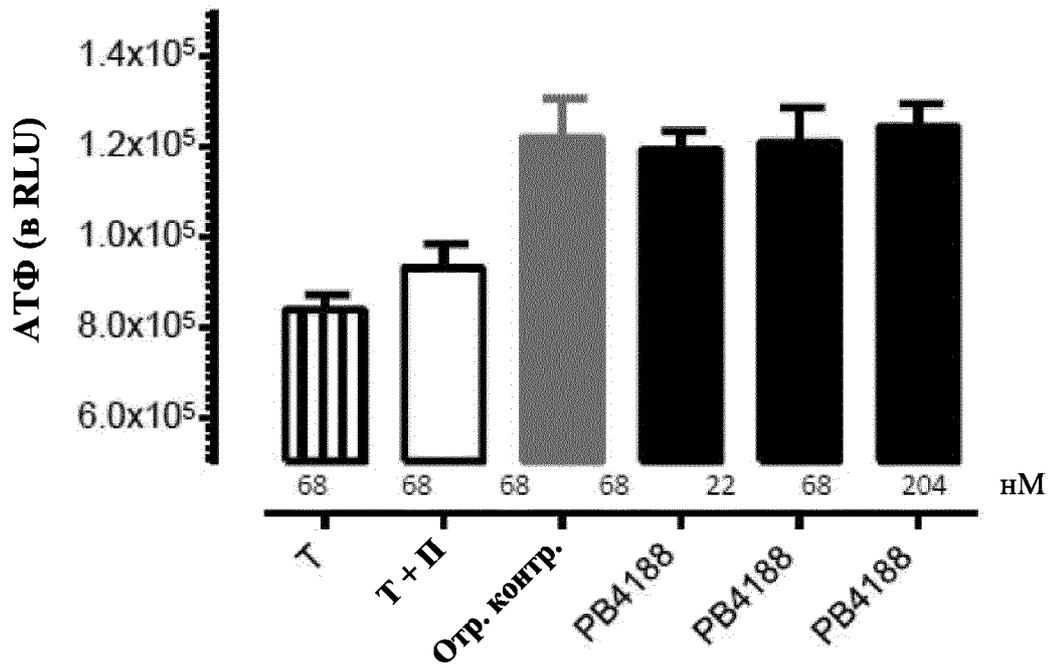
**Фигура 22**



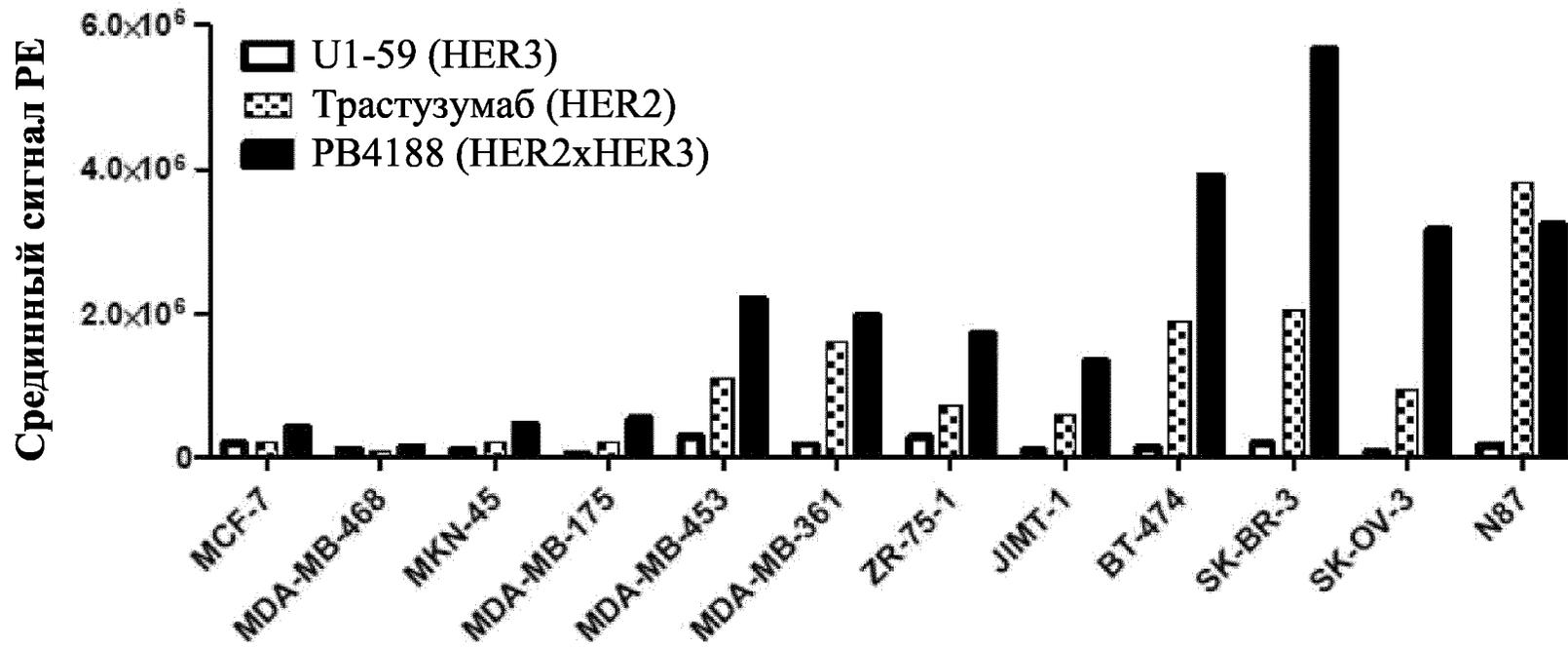
**Фигура 23**



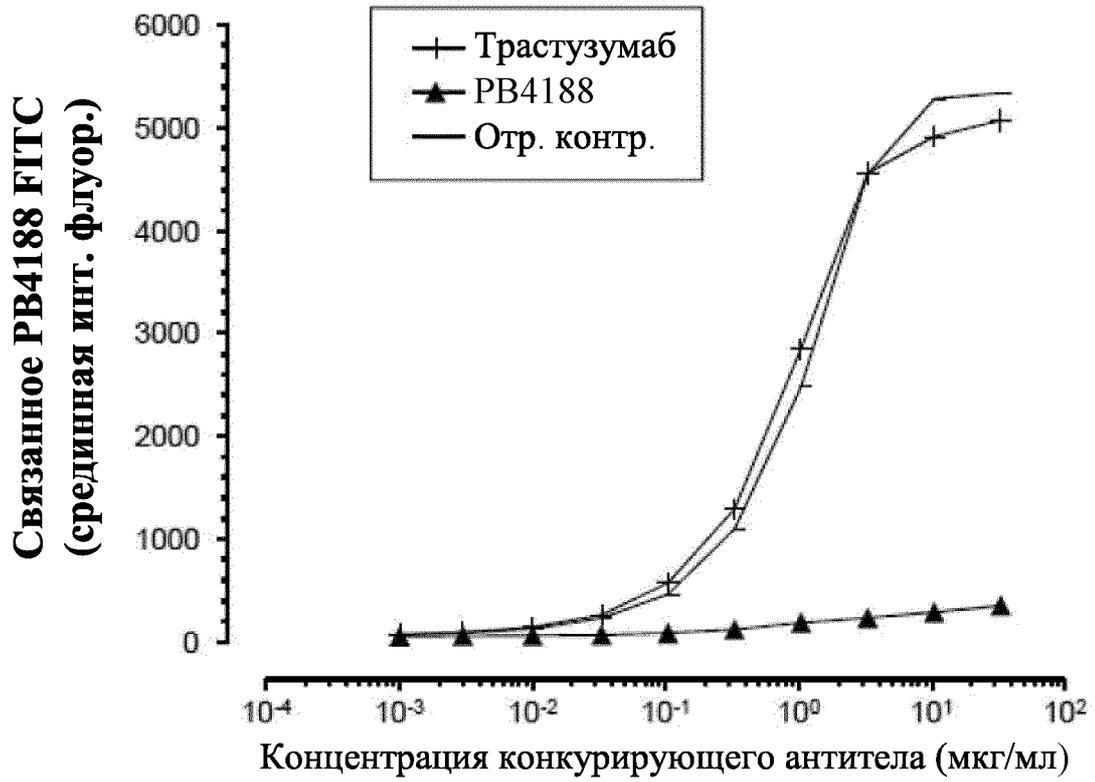
**Фигура 24**



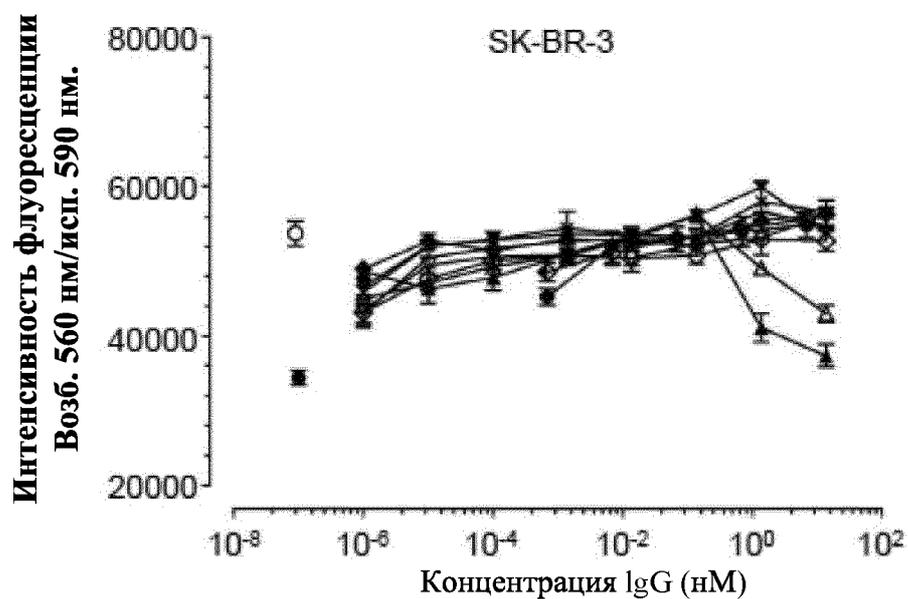
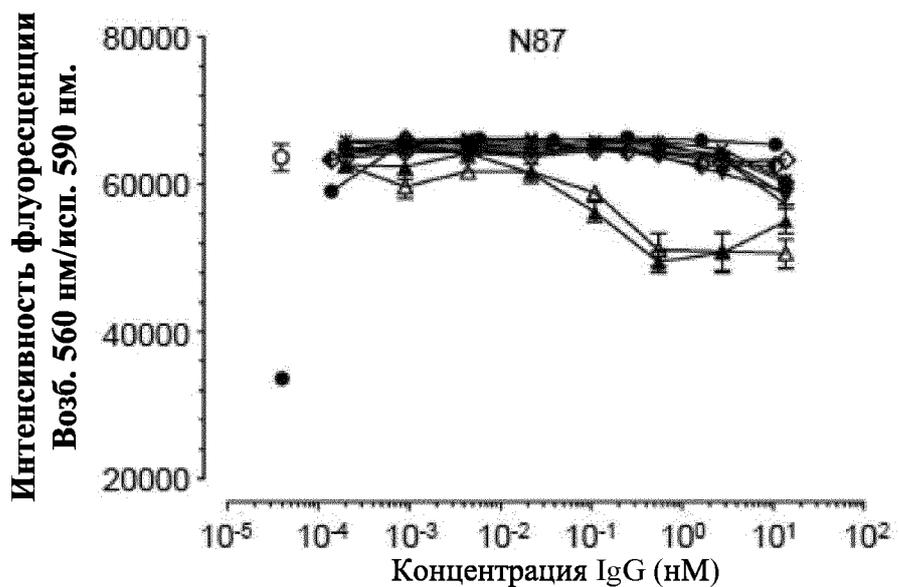
**Фигура 25**



Фигура 26

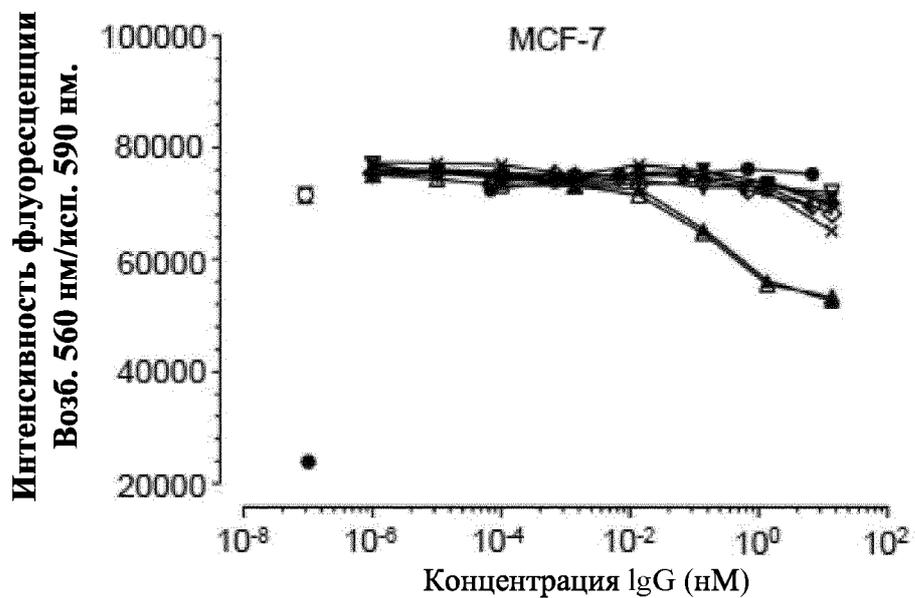
**Фигура 27**

★ PB4188 (дом I) MF3958	✖ PB3448 (дом IV) MF1849
▲ PB3435 (дом I) MF3003	+ PB3445 (дом IV) MF1898
▼ PB3438 (дом II) MF2889	◆ Трастузумаб
▽ PB9433 (дом II) MF2913	● Отр. контроль
◆ PB3444 (дом III) MF1847	○ Исходная с лигандом
◇ PB3442 (дом III) MF3001	● Исходная без лиганда

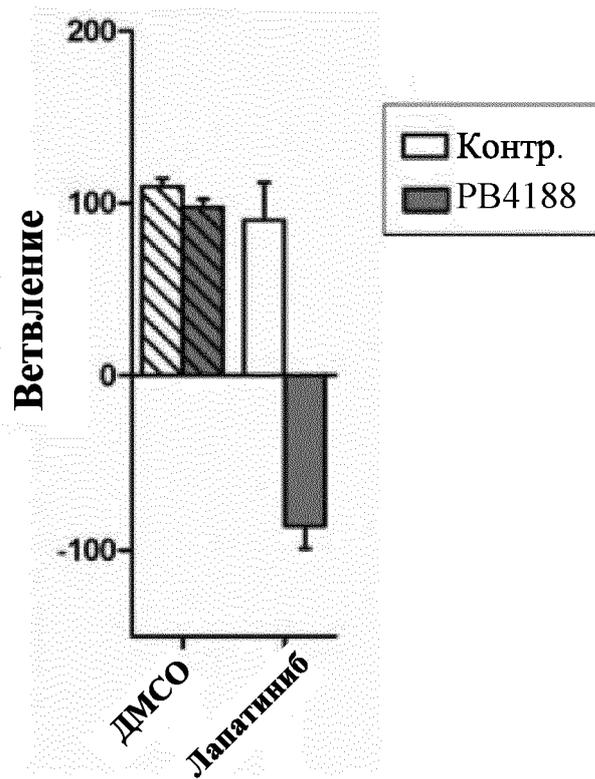
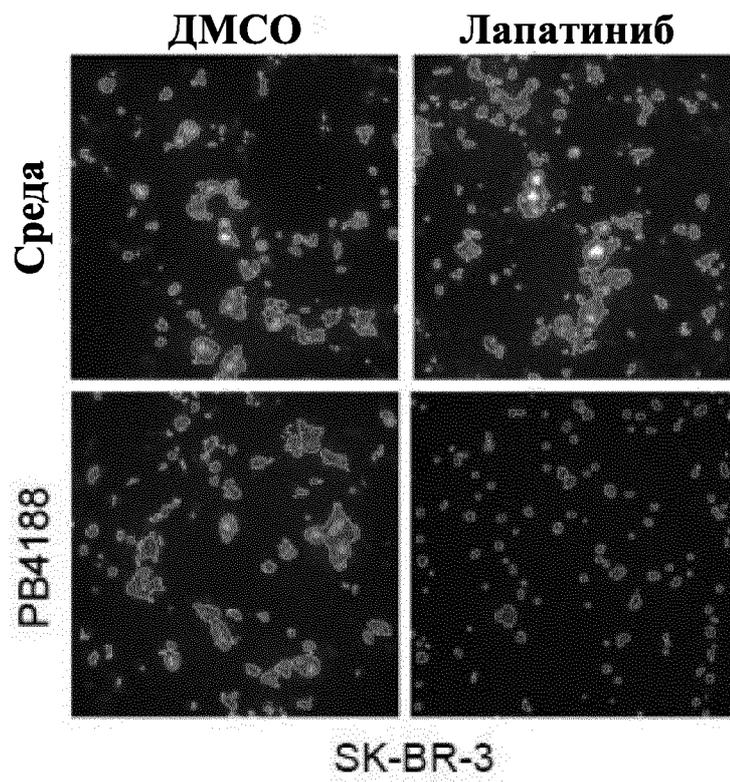


**Фигура 28**

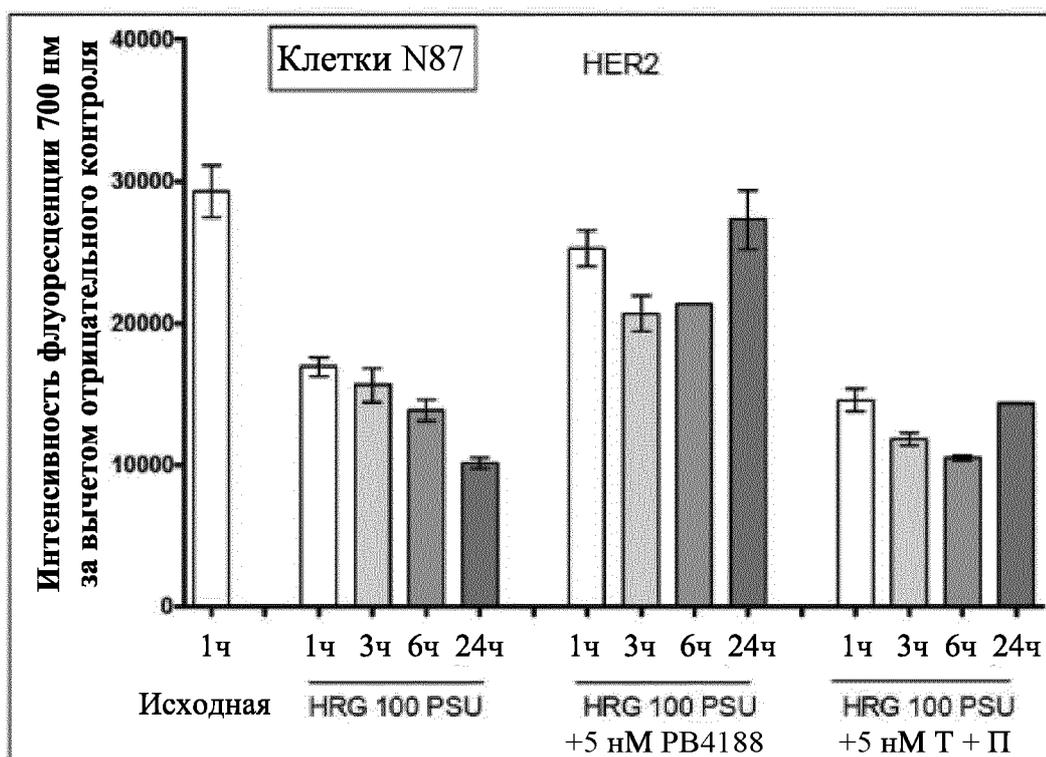
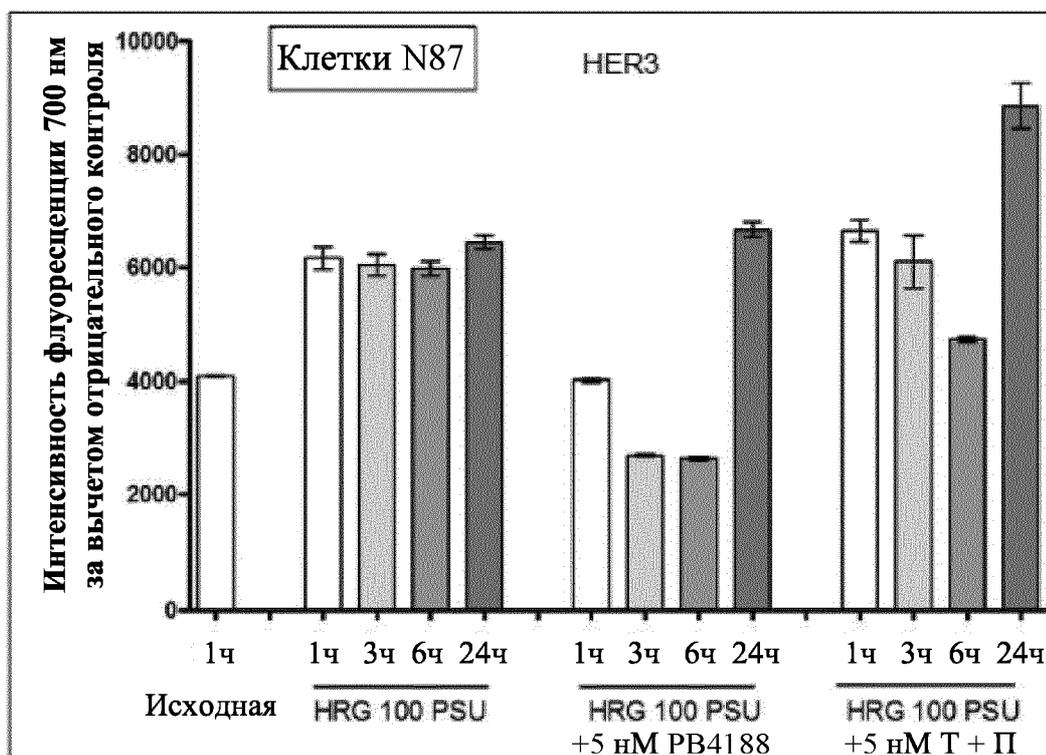
★ PB4188 (ДОМ I) MF3958	✱ PB3448 (ДОМ IV) MF1849
☆ PB3435 (ДОМ I) MF3003	+ PB3445 (ДОМ IV) MF1898
✦ PB3438 (ДОМ II) MF2889	◆ Трастузумаб
✧ PB9433 (ДОМ II) MF2913	● Отр. контроль
◆ PB3444 (ДОМ III) MF1847	○ Исходная с лигандом
◇ PB3442 (ДОМ III) MF3001	● Исходная без лиганда



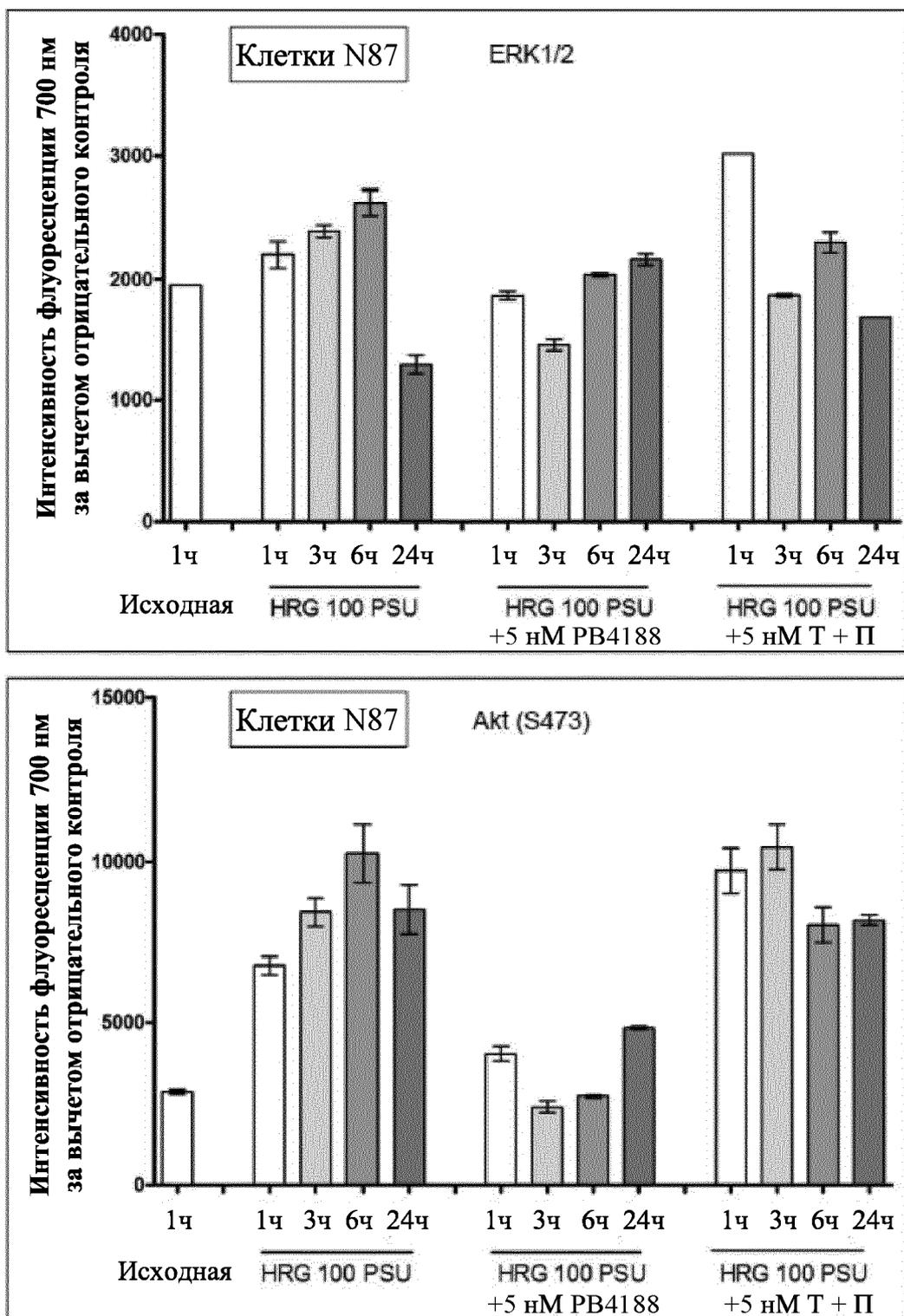
Фигура 28, продолжение



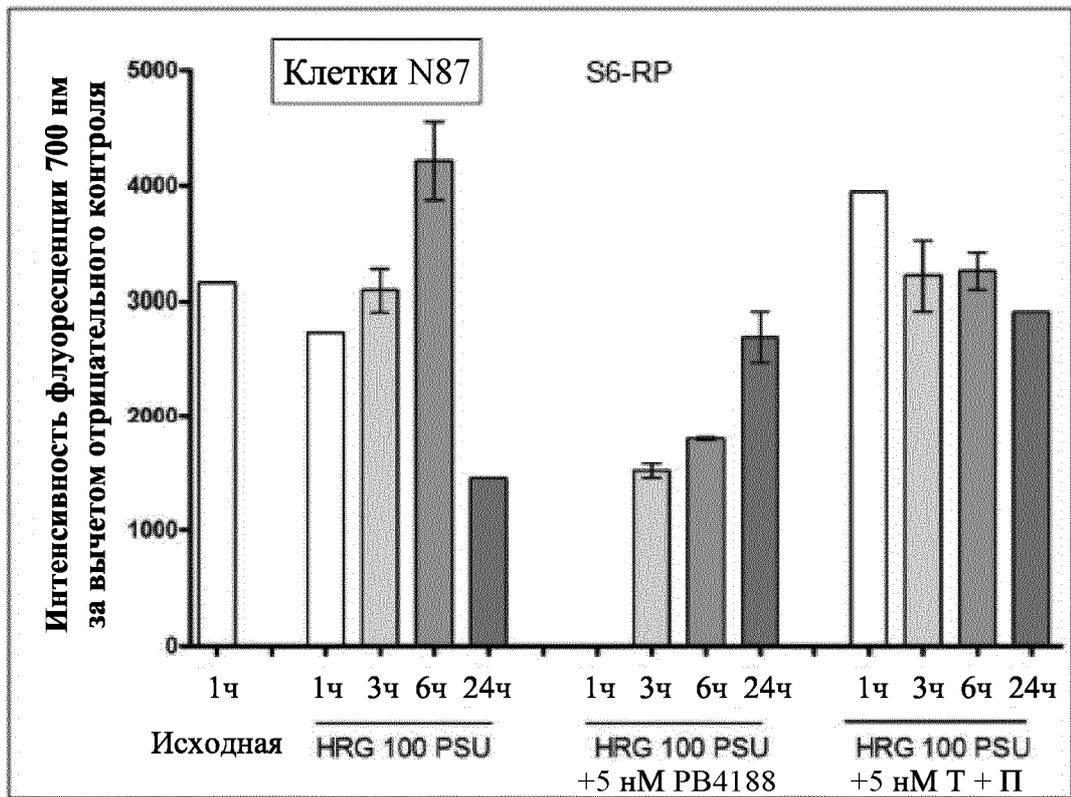
Фигура 29



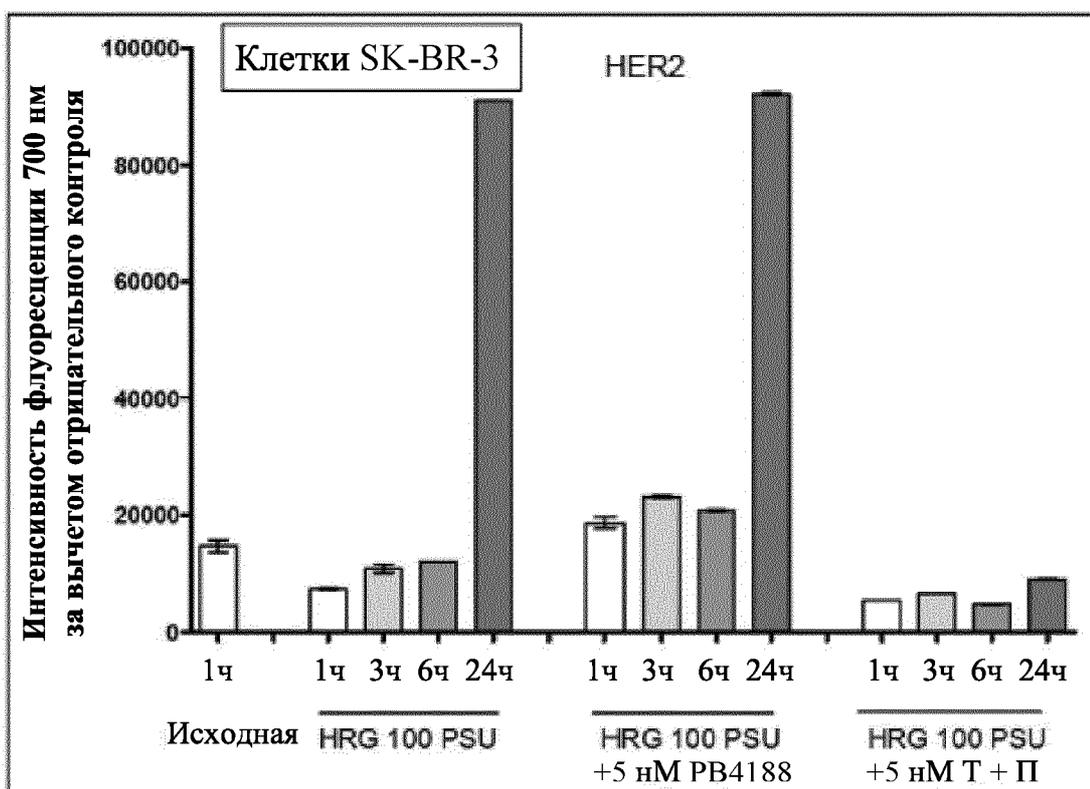
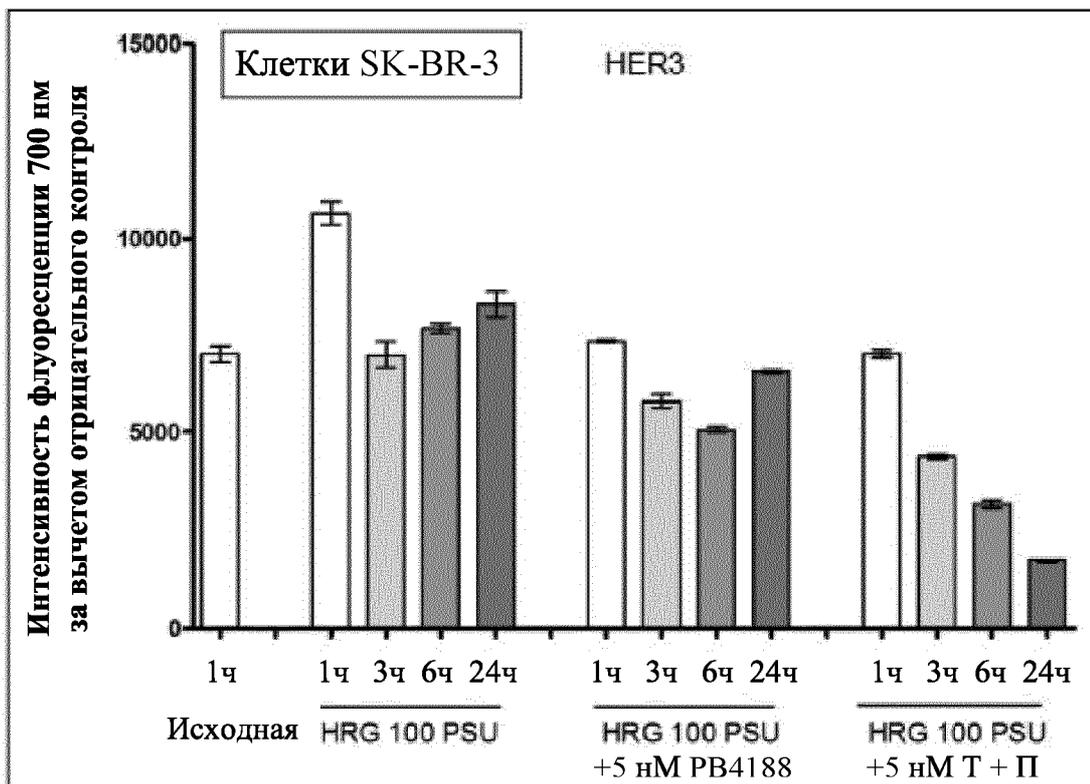
Фигура 30А



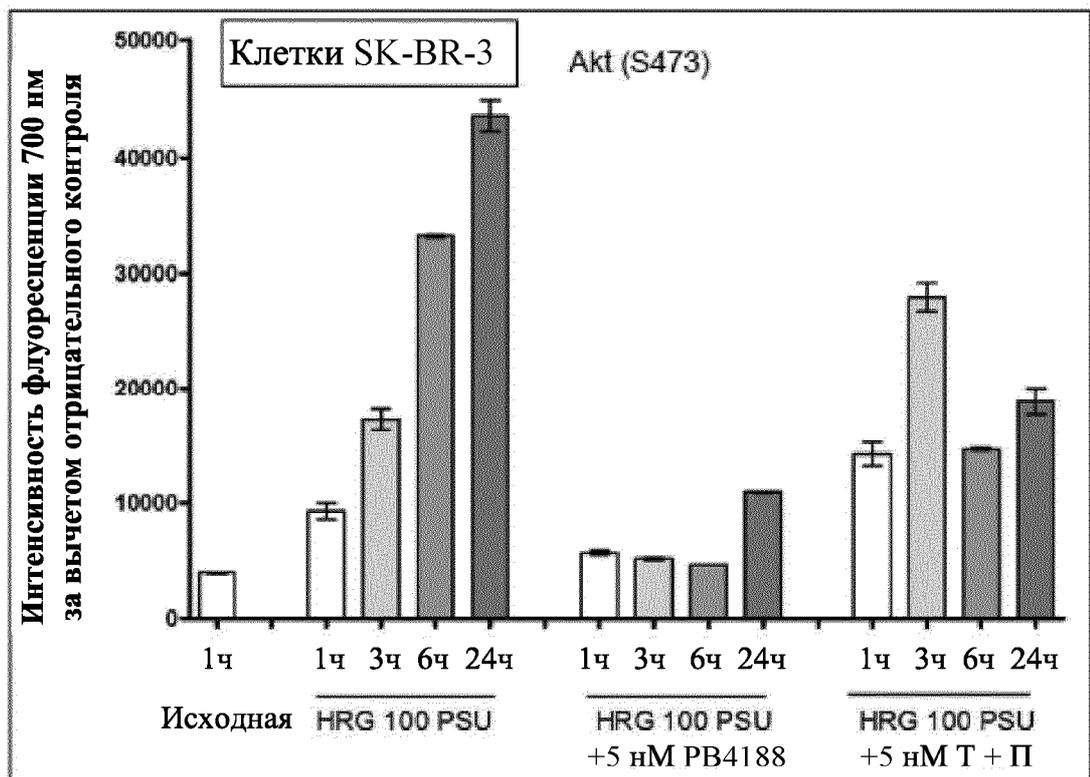
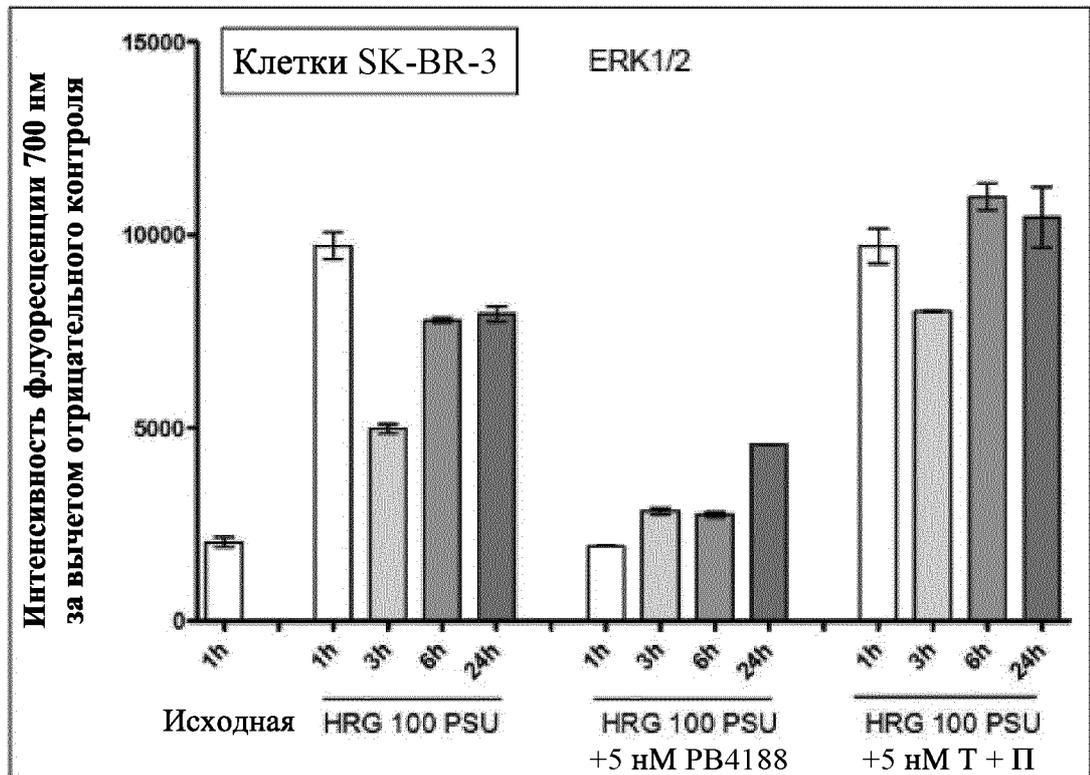
**Фигура 30А, продолжение**



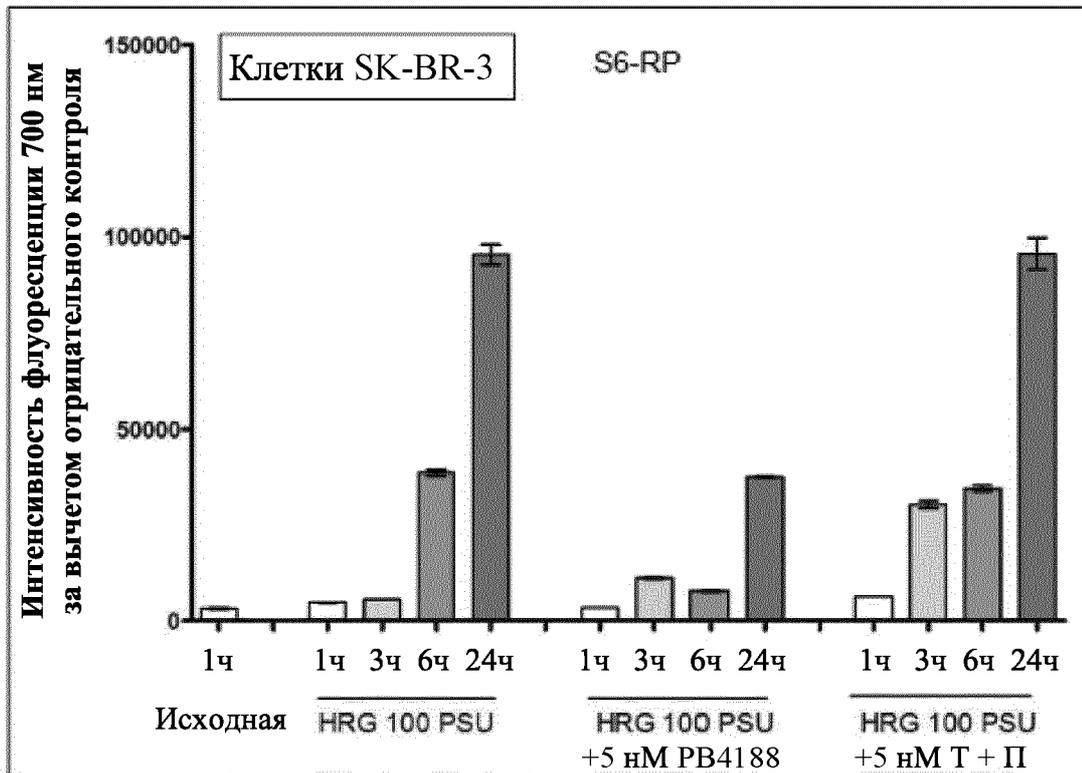
**Фигура 30А, продолжение**



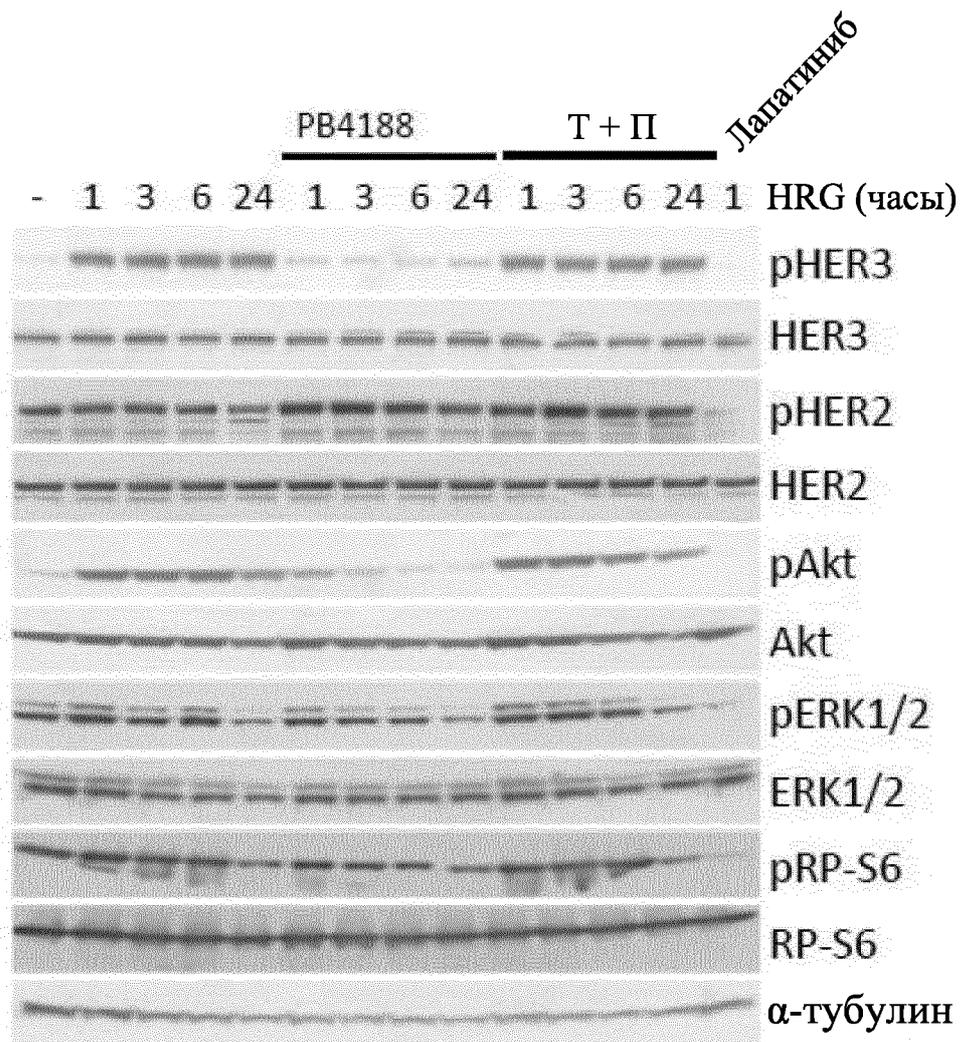
Фигура 30В

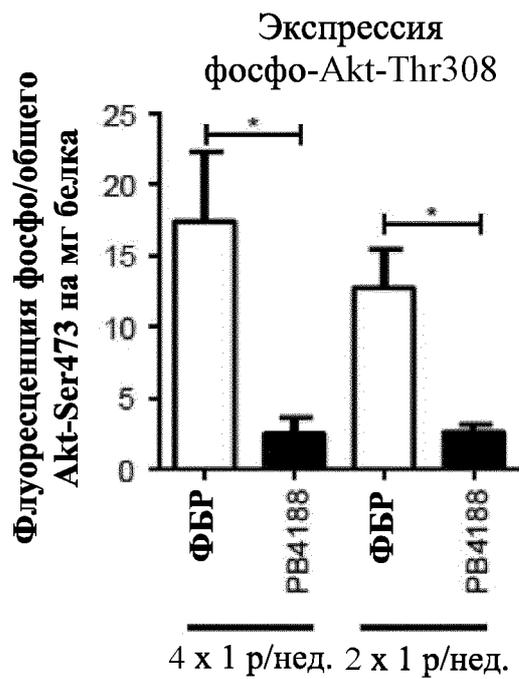
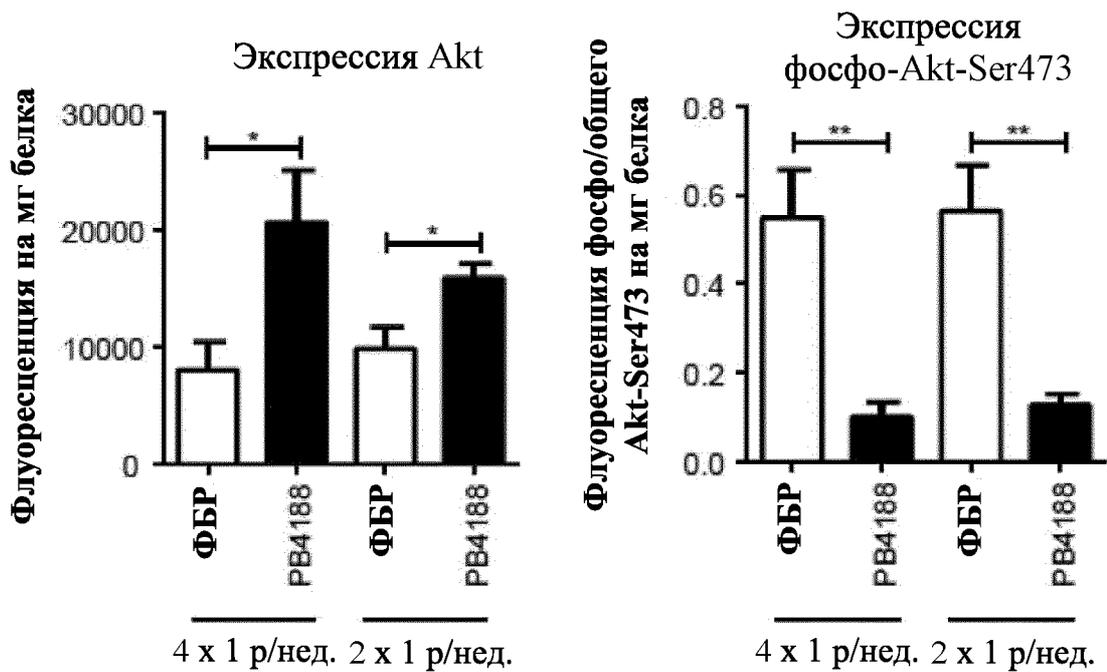


Фигура 30В, продолжение

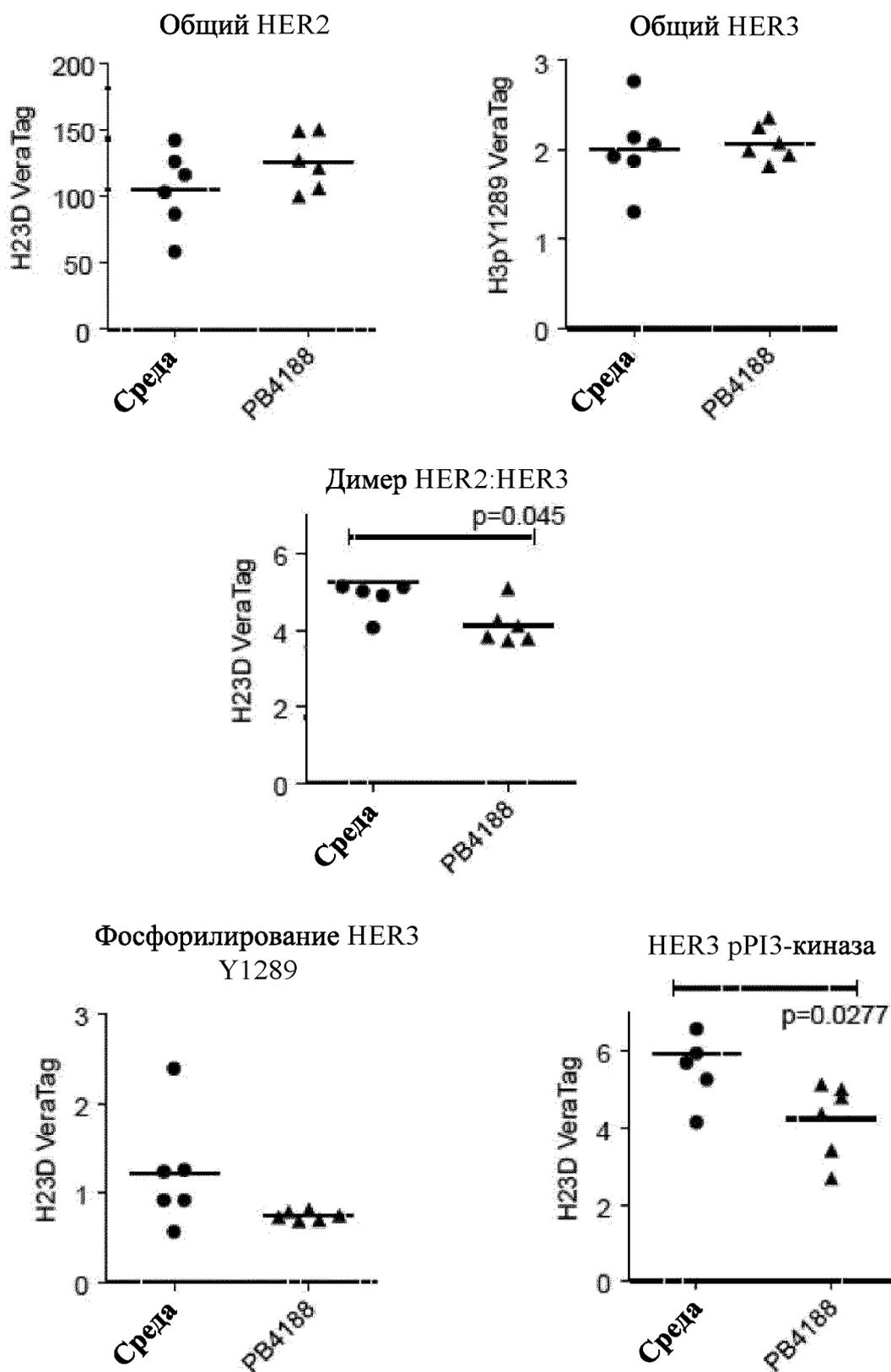


Фигура 30В, продолжение

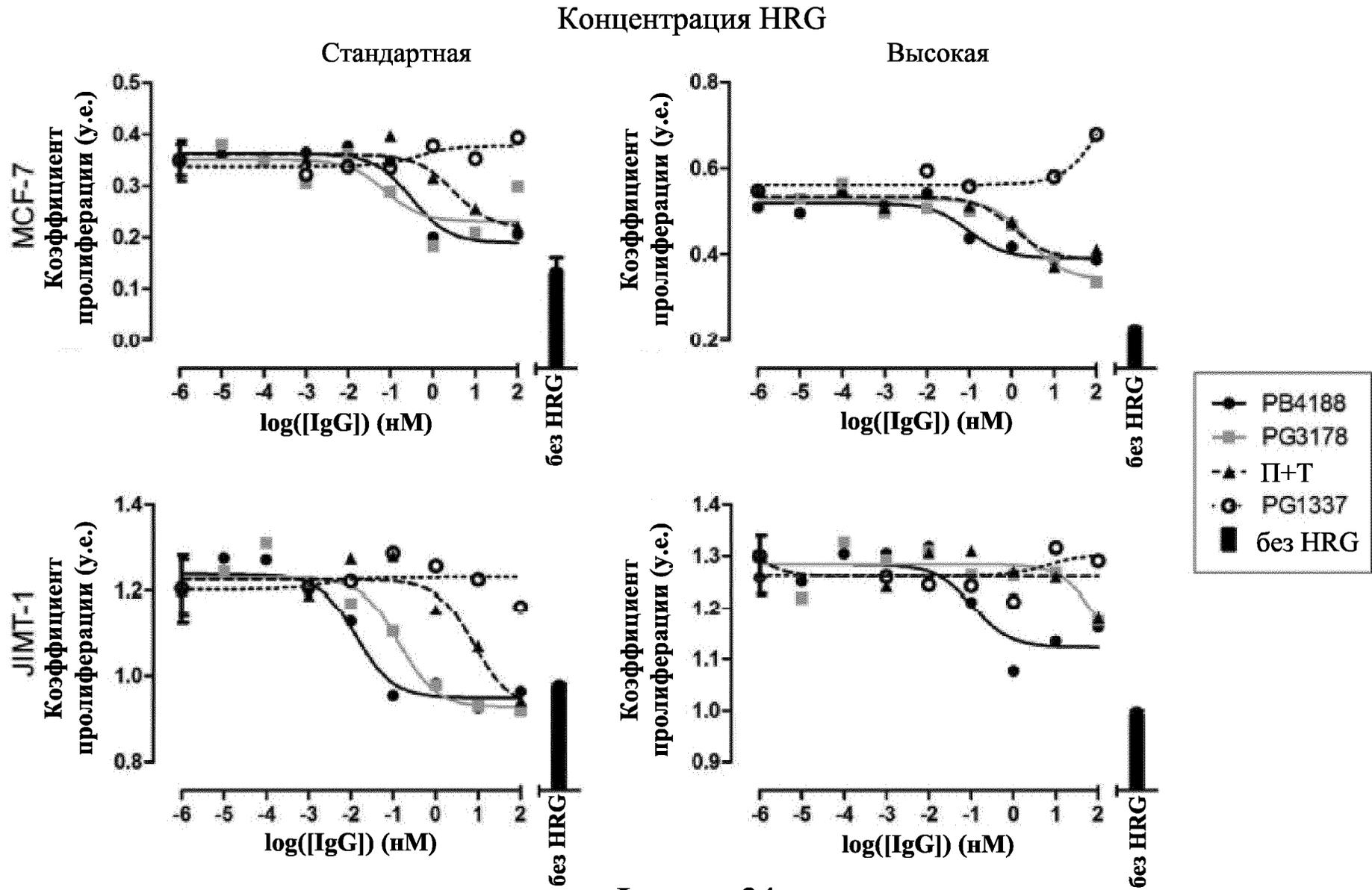
**Фигура 31**



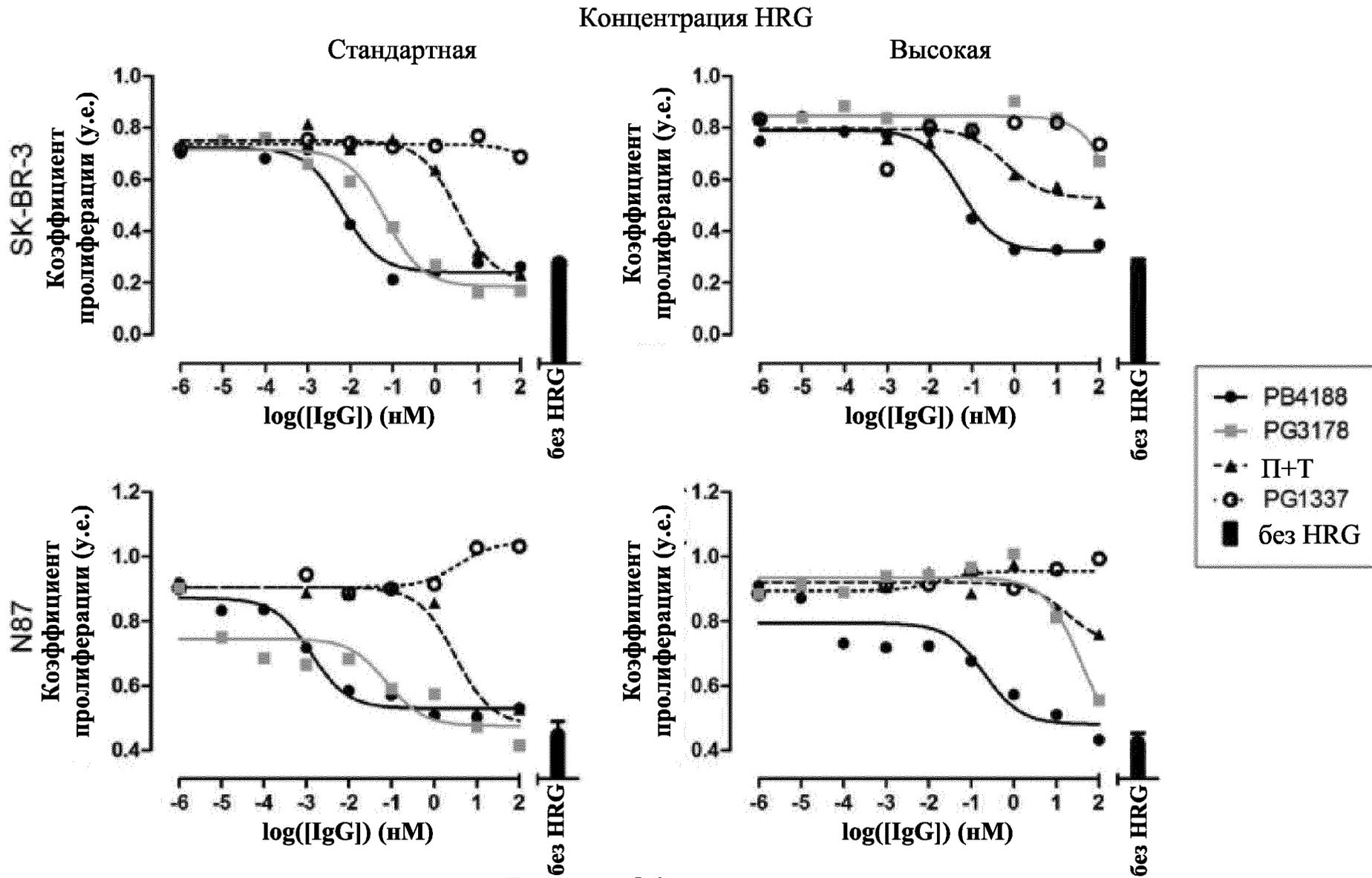
**Фигура 32**



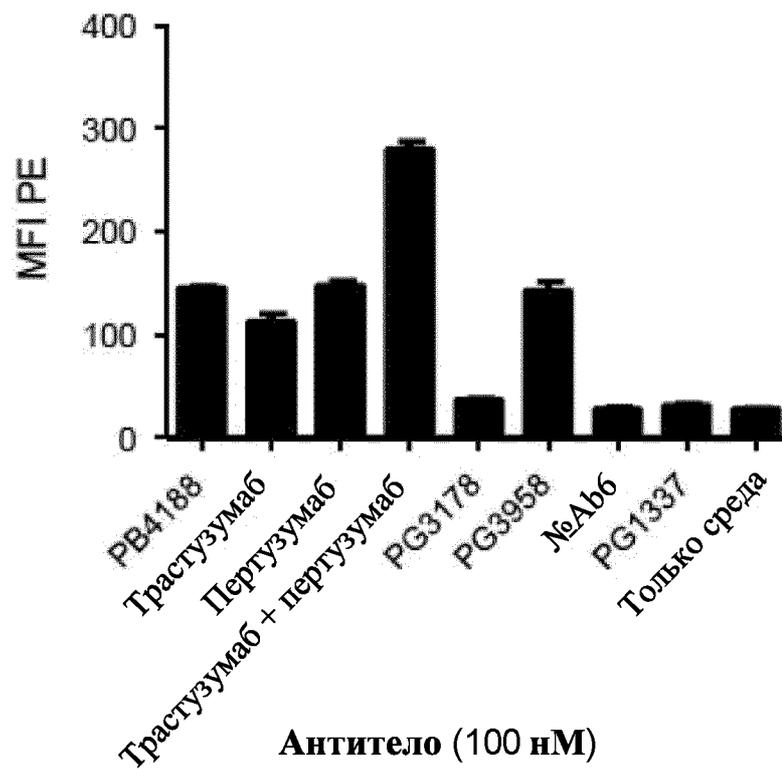
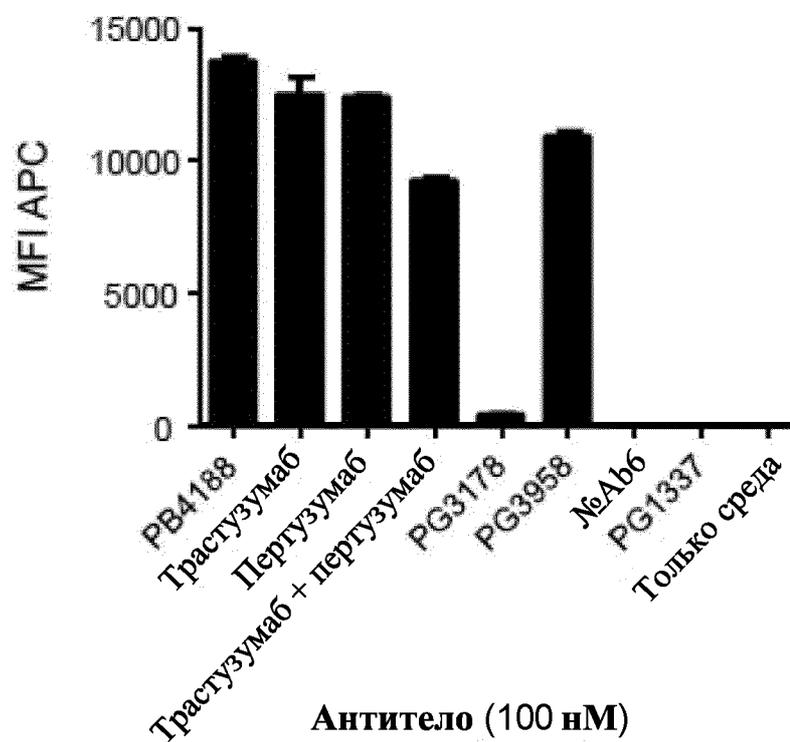
Фигура 33

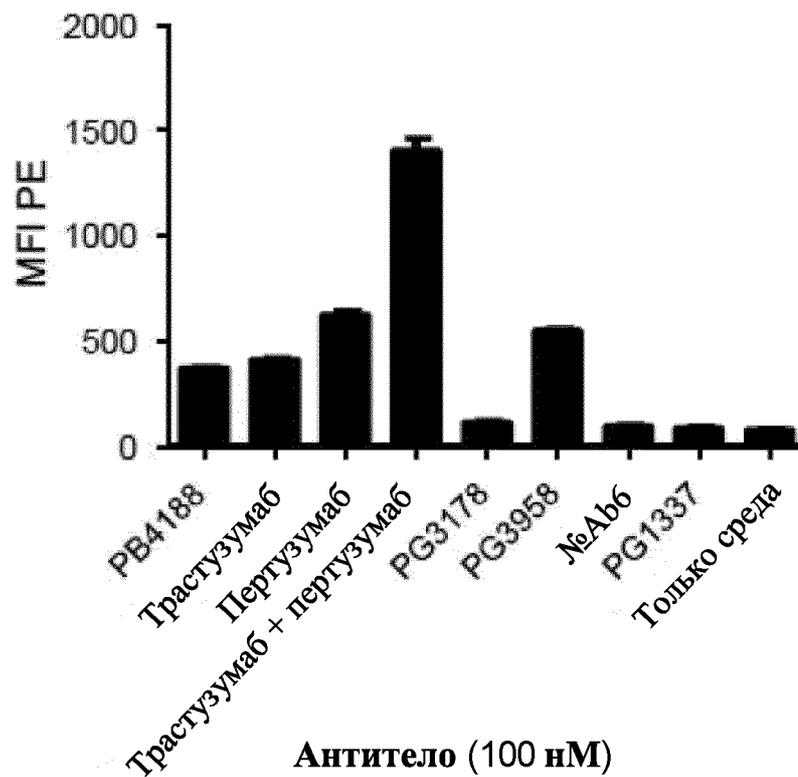
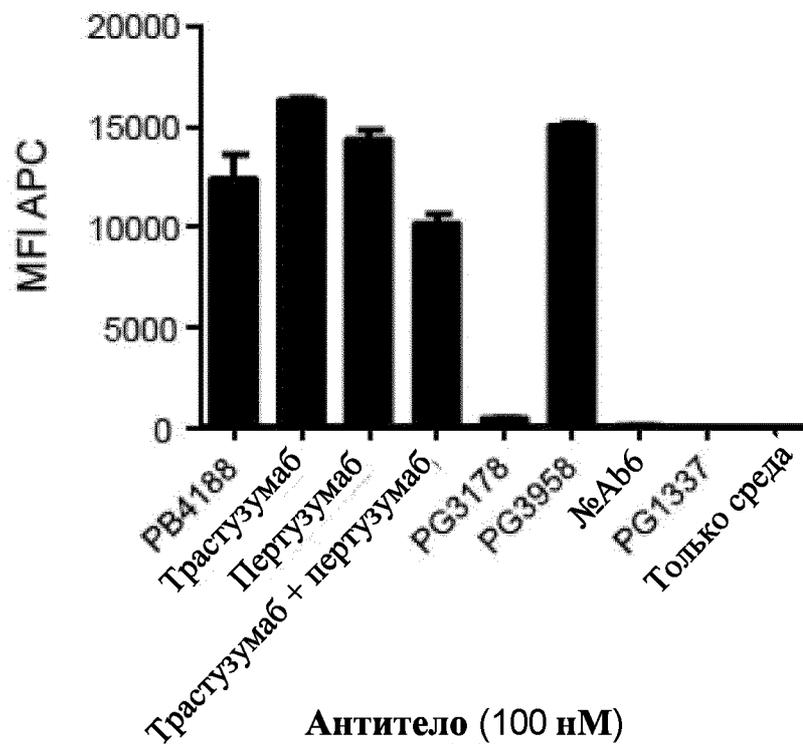


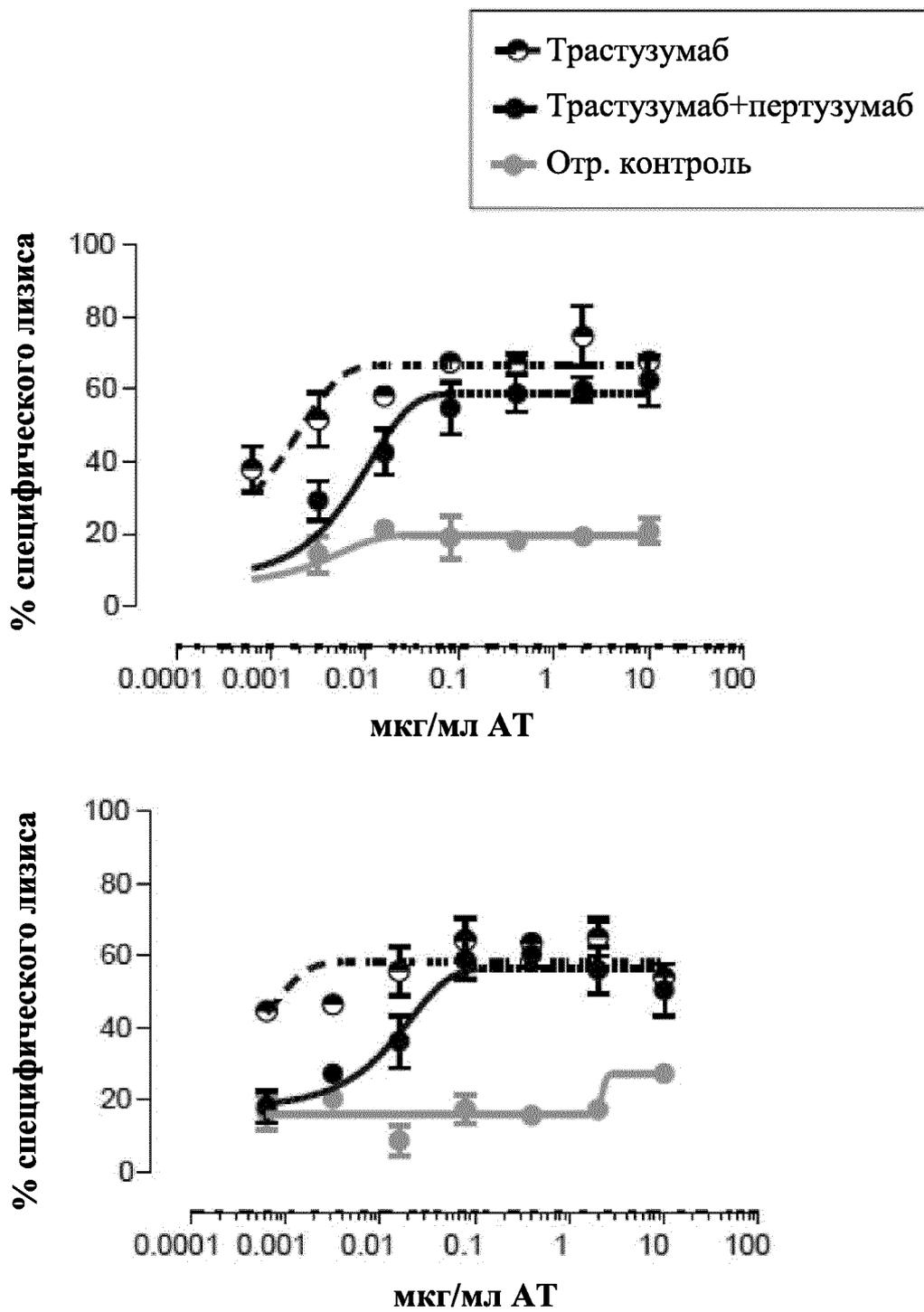
**Фигура 34**



Фигура 34, продолжение

**Фигура 35А****Фигура 35В**

**Фигура 35С****Фигура 35D**



Фигура 36



## Фигура 37, продолжение

Выравнивание последовательностей нуклеиновых кислот вариантов MF3178 (без конца лидерной последовательности)

```
MF3178 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
MF6058 .....C.....A.G.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

### CDR1

```
MF3178 GCTTCTGGATACACCTTCACC GGCTACTATATGCAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
MF6058 .....CT.....
MF6061 .....
MF6065 .....TCT.....
```

### CDR2

```
MF3178 AGTGGATGGGA TGGATCAACCCCTAACAGTGGTGGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGT
MF6058 .....C.A.....A.....
MF6061 .....C.G.....A.....
MF6065 .....C.GG.G...TCT.....
```

```
MF3178 CACGATGACCAGGGACACGCTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
MF6058 .T.T.....G.....CA.....C.....
MF6061 .....C.....
MF6065 .....C.....TG.....G.....
```

### CDR3

```
MF3178 GGCTGTGTATTACTGTGCAAGA GATCATGGTTCTCGTCAATTTCTGGTCTTACTGGGGCTTTGATAT
MF6058 .....AC.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

```
MF3178 TGGGGCCAAGGTACCCTGGTCAACCGTCTCCAGT
MF6058 .....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

## Фигура 37, продолжение

Последовательности ДНК вариантов MF3178 (без конца лидерной последовательности)

MF6055

>MF6055\_VH

```
caggtgcagctggtgcagtcctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtcctctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgactgggtgcgacaggccccctggacaagctcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggtggcacaactatgcaagaagtttcagggcaggggtcacgatg  
accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggctttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6056

>MF6056\_VH

```
caggtgcagctggtgcagtcctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtcacgtgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgactgggtgcgacaggccccctggacaagctcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggtggcacaactatgcaagaagtttcagggcaggggtctctatg  
accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggctttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6057

>MF6057\_VH

```
caggtgcagctggtgcagtcctggggctgatgtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtcacgtgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgactgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg  
accagggacacgtccatcagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggctttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6058

>MF6058\_VH

```
caggtgcagctggtgcagtcctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtcacgtgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgactgggtgcgacaggccccctggacaagctcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcaagtgggtggcacaactatgcaagaagtttcagggcaggggtctctatg  
accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggctttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

## Фигура 37, продолжение

MF6059

>MF6059\_VH

```
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatataatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg  
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6060

>MF6060\_VH

```
caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatataatgcactgggtgacagggcccctggacaaggtcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcaagtggggcacaactatgcaagaagtttcagggcagggtcacgatg  
accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6061

>MF6061\_VH

```
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatataatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggggcacaactatgcacagaagtttaagggcagggtcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6062

>MF6062\_VH

```
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatataatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg  
accagggacacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

**Фигура 37, продолжение**

MF6063

&gt;MF6063\_VH

```
caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcaagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6064

&gt;MF6064\_VH

```
caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggaaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccacgagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6065

&gt;MF6065\_VH

```
caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcacccttactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcaggggggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagtgatcatggagctgagcaggctgagatctgaggacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6066

&gt;MF6066\_VH

```
caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgaggacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt
```

**Фигура 37, продолжение**

MF6067

&gt;MF6067\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagctctacatggagctgagctctctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

MF6068

&gt;MF6068\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

MF6069

&gt;MF6069\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

MF6070

&gt;MF6070\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccttactataatgcaactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctgggggttctacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagtgatcatggagctgagcaggctgagatctgaggacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

**Фигура 37, продолжение**

MF6071

&gt;MF6071\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctcctctgagatctgaggacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

MF6072

&gt;MF6072\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagctacatggagctgagctcctctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

MF6073

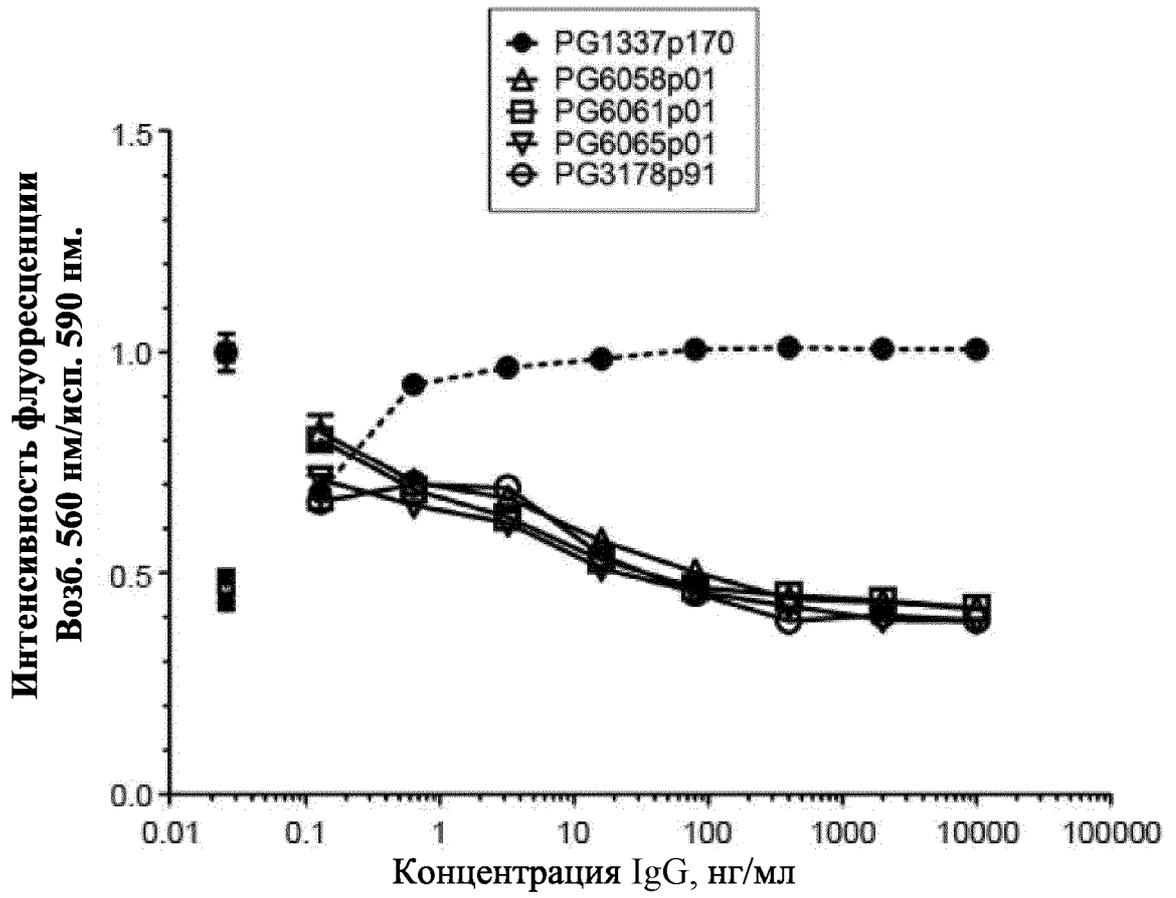
&gt;MF6073\_VH

caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt

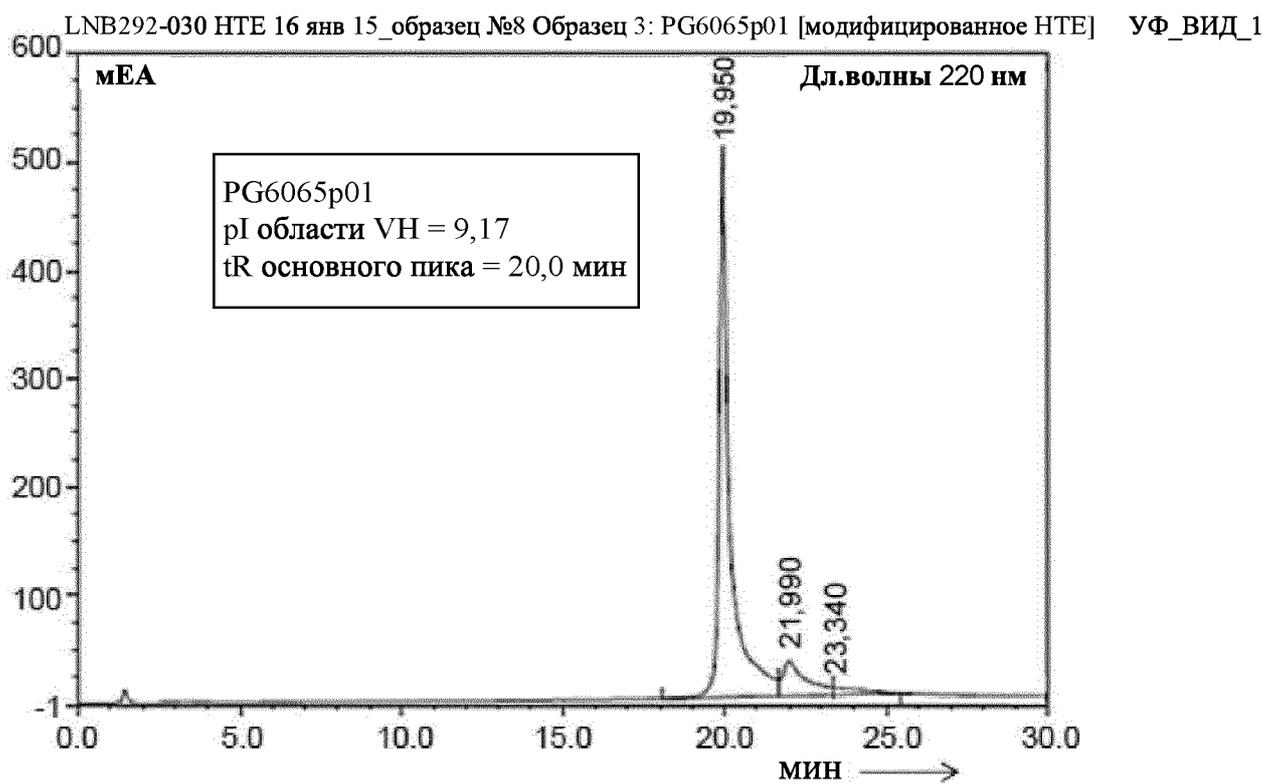
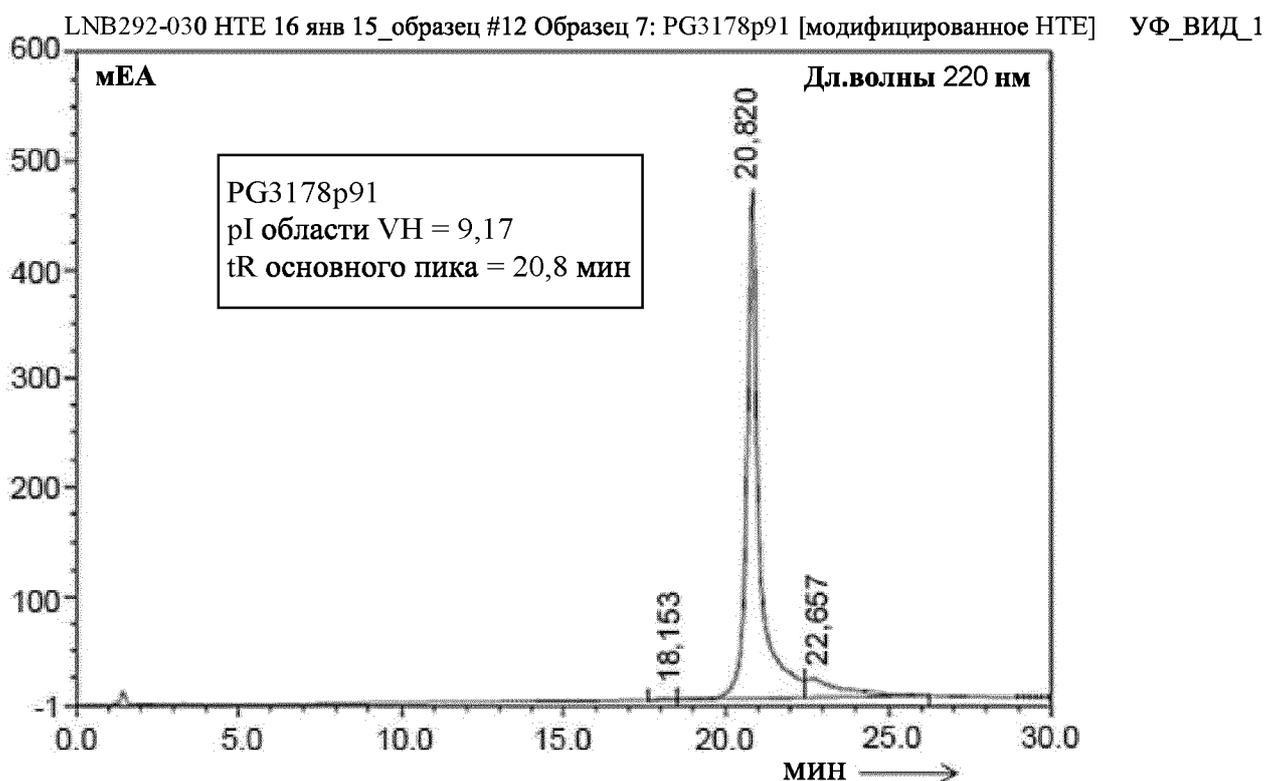
MF6074

&gt;MF6074\_VH

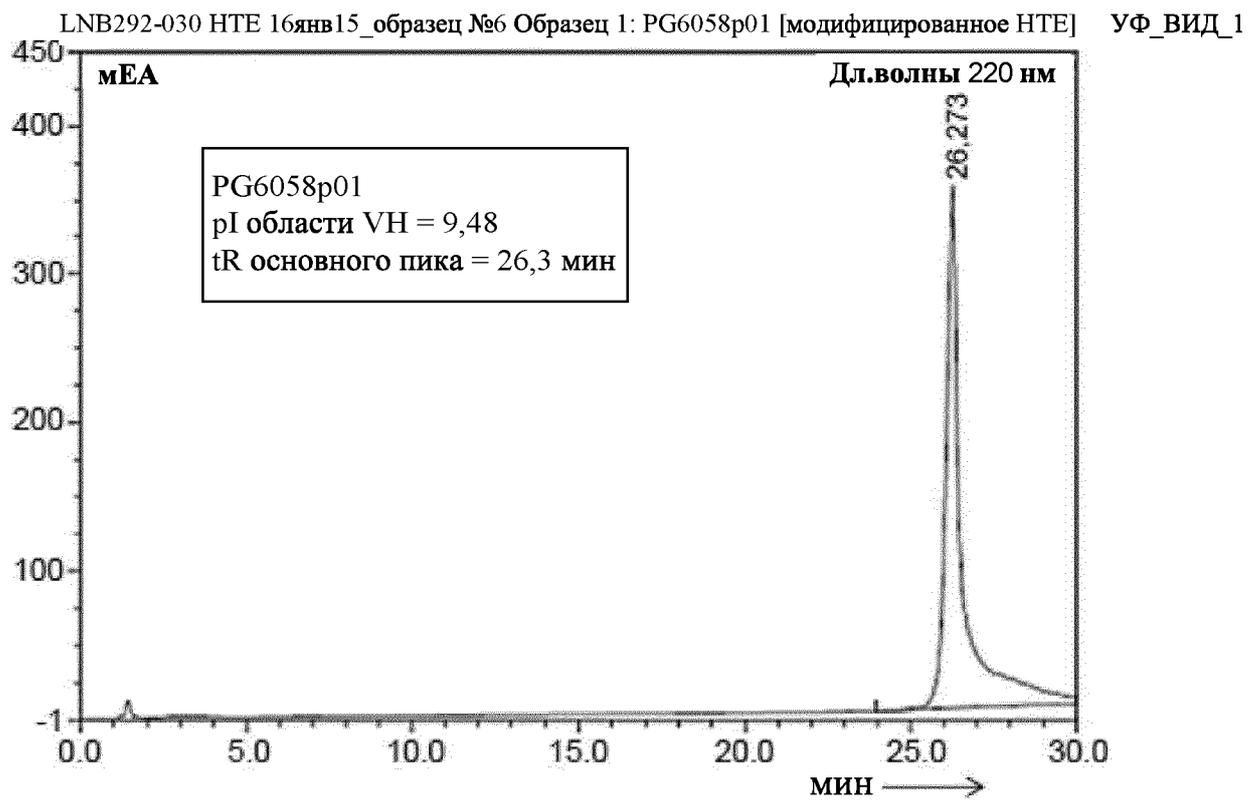
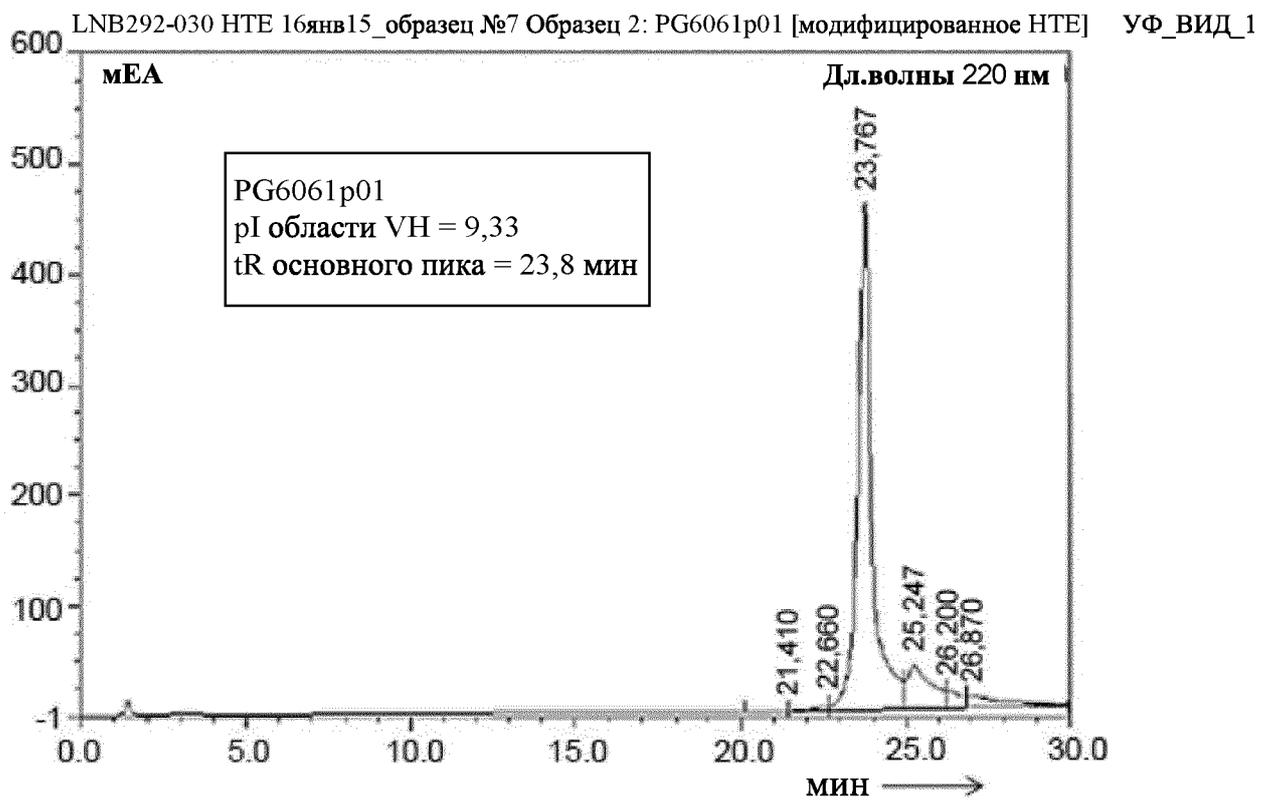
caggtgcāgctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggcccctggacaagggcttgagtg  
gatgggatggatcaacccttctagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcacgatg  
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt  
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggcttactggggccttgattattggggccaagg  
taccctggtcaccgtctccagt



Фигура 38

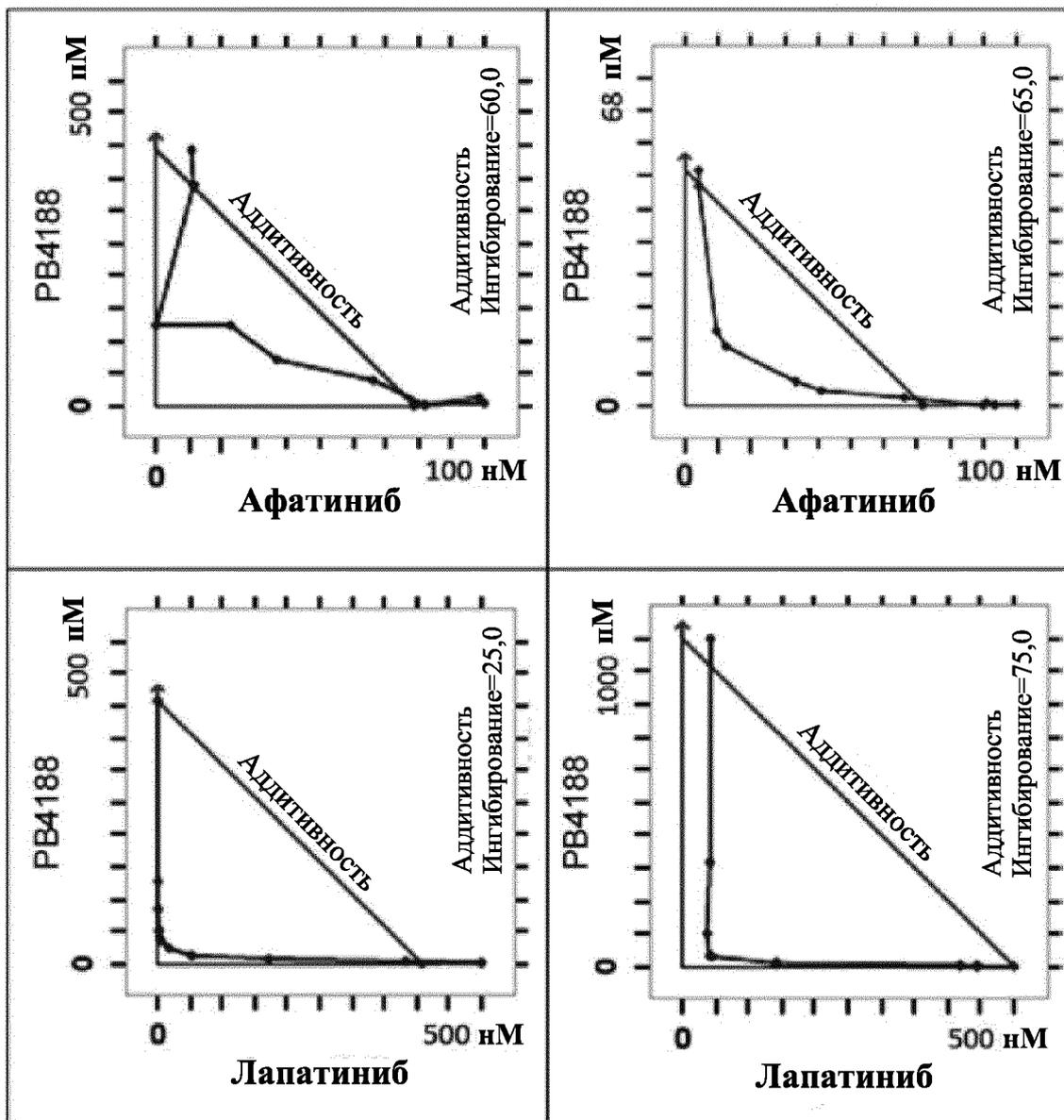


ФИГУРА 39

**ФИГУРА 39, продолжение**

SK-BR-3

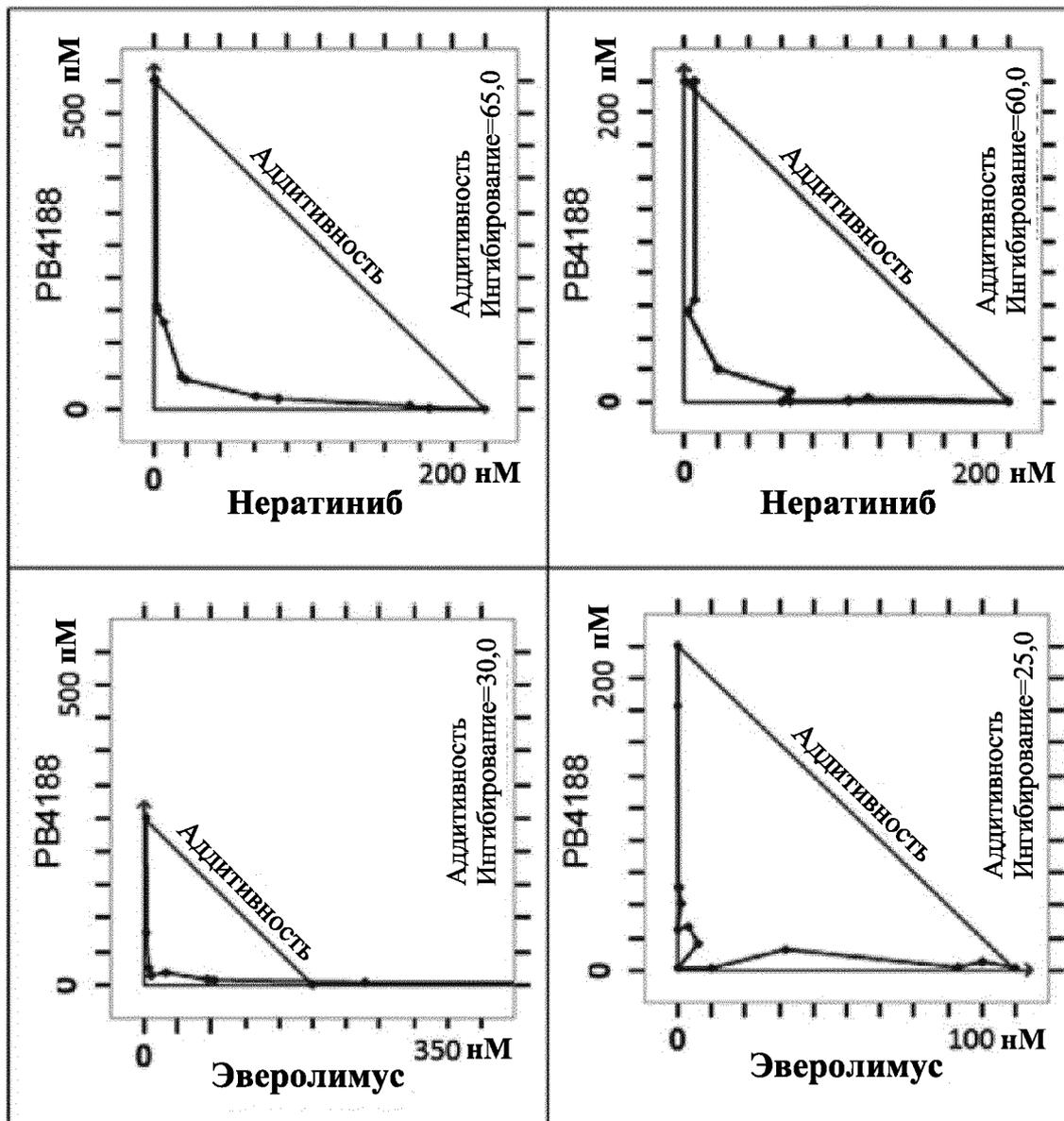
N87



Фигура 40А

SK-BR-3

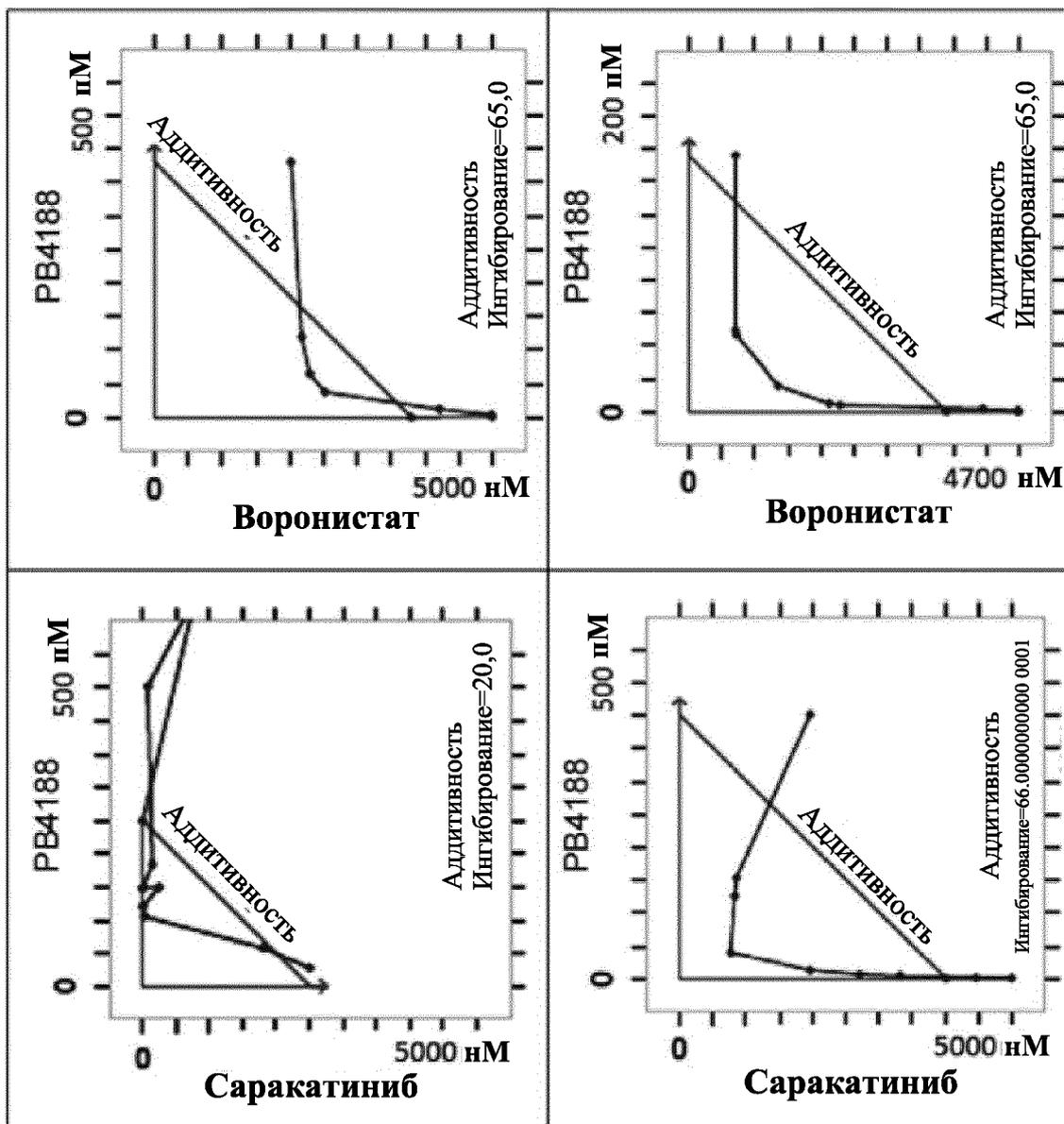
N87



Фигура 40А, продолжение

SK-BR-3

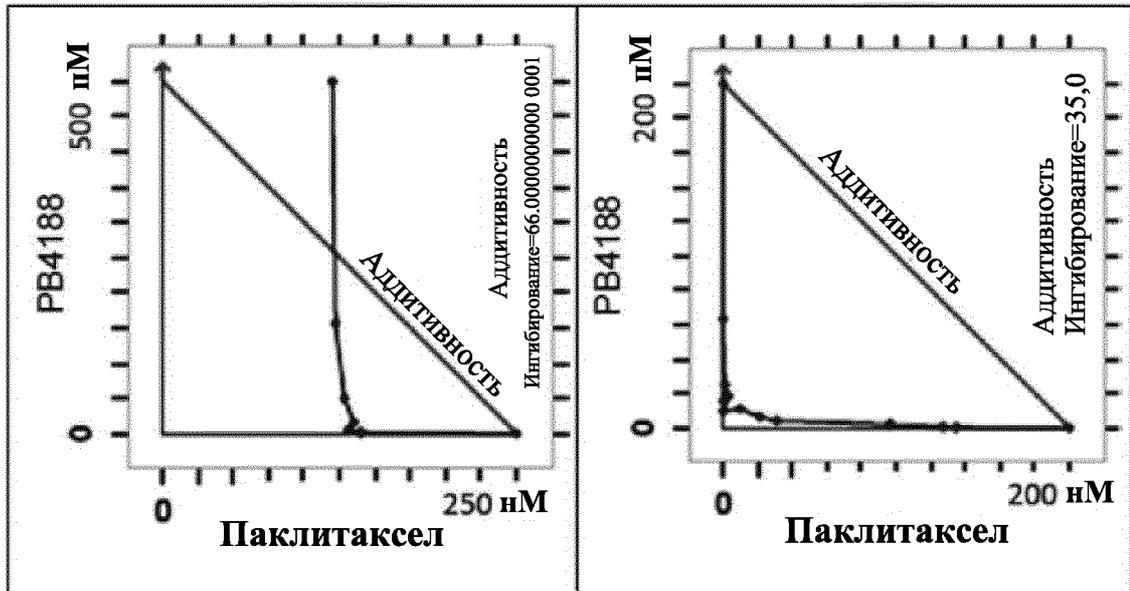
N87



Фигура 40А, продолжение

SK-BR-3

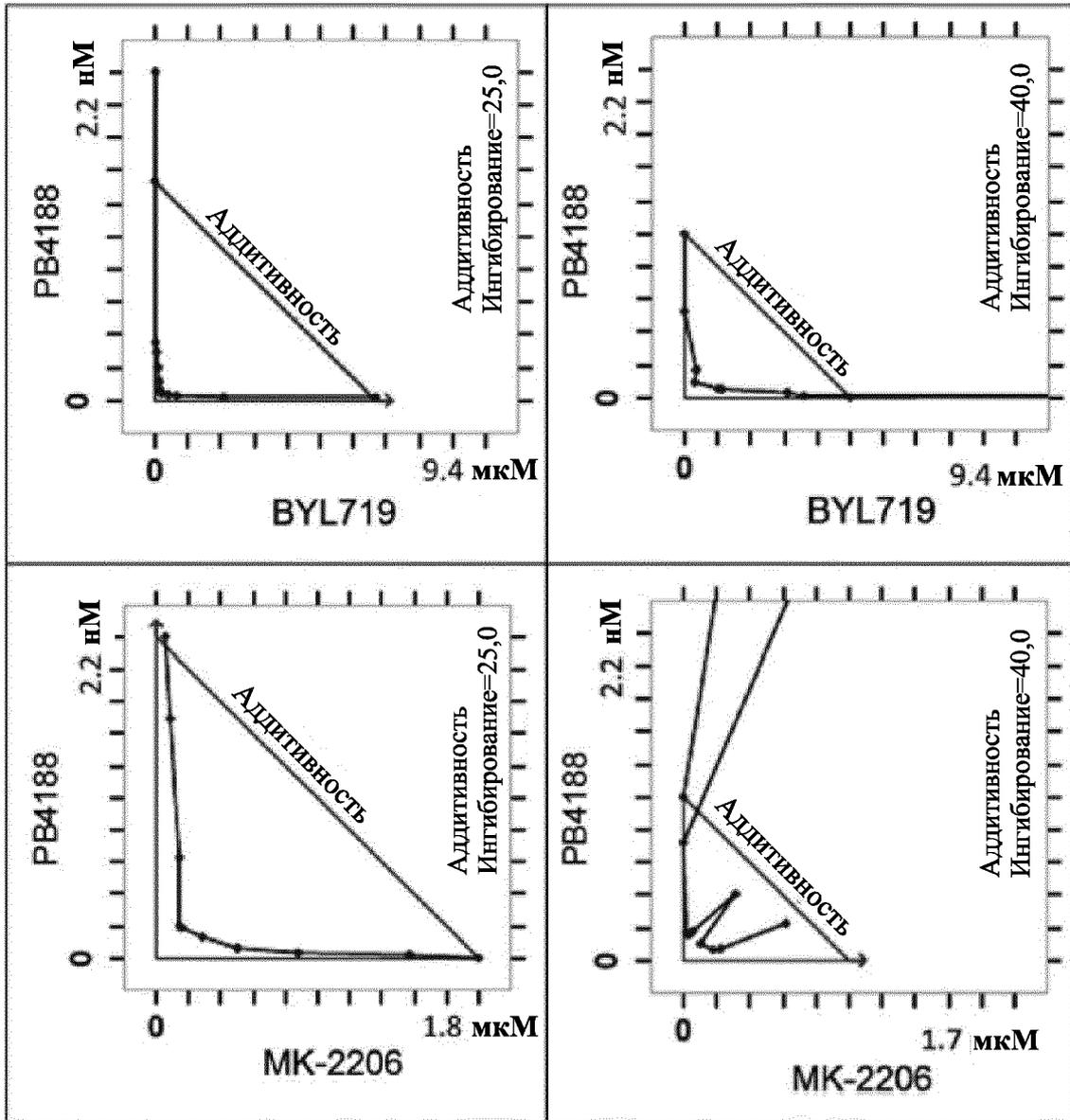
N87



Фигура 40А, продолжение

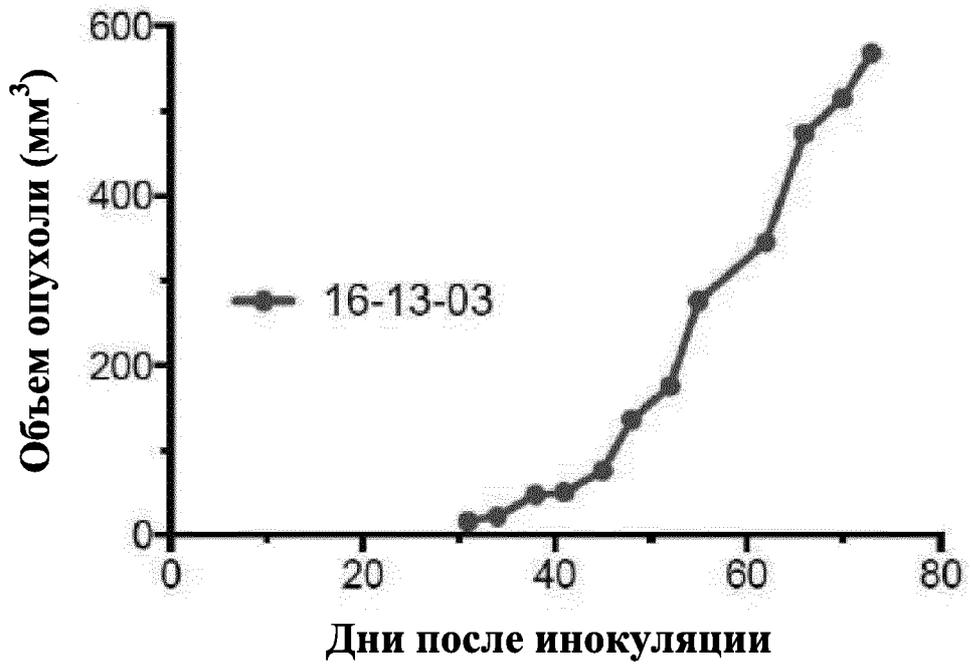
SK-BR-3

BT474

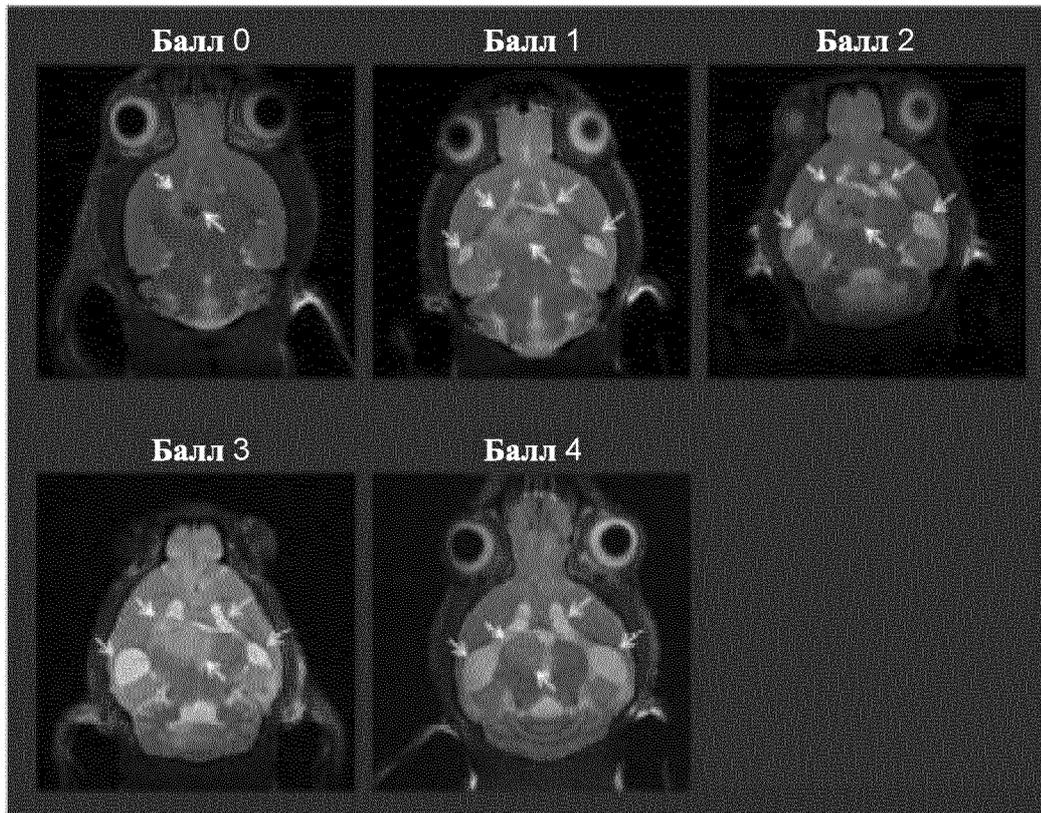


Фигура 40В

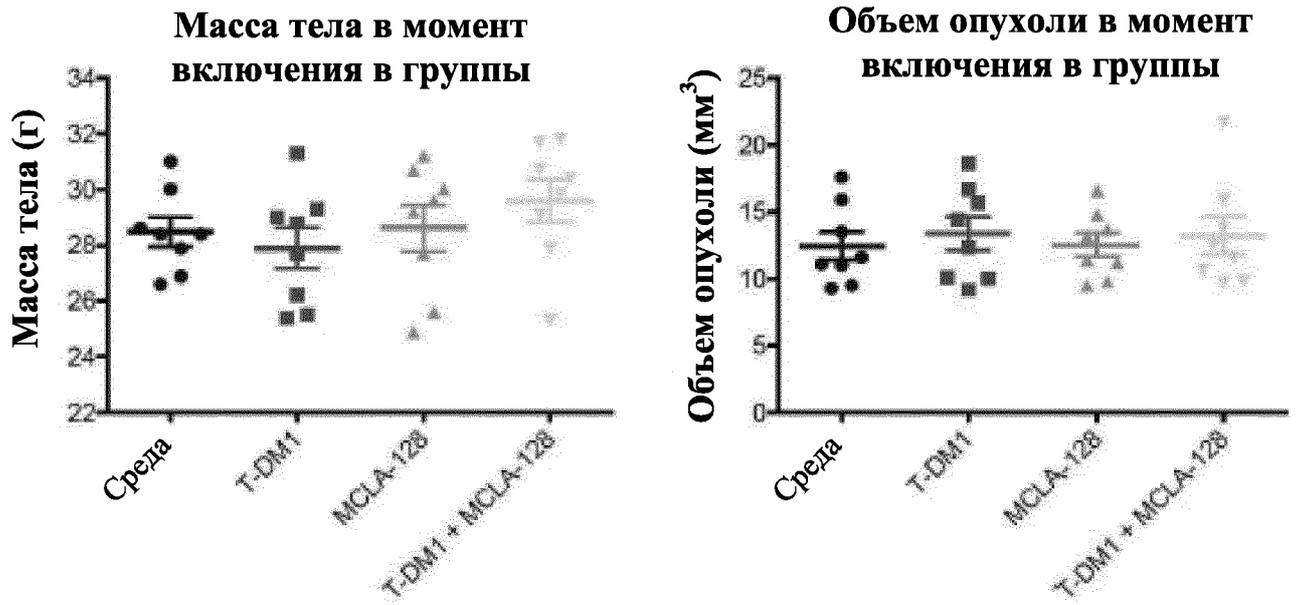
**ST1360B П4 п/к**



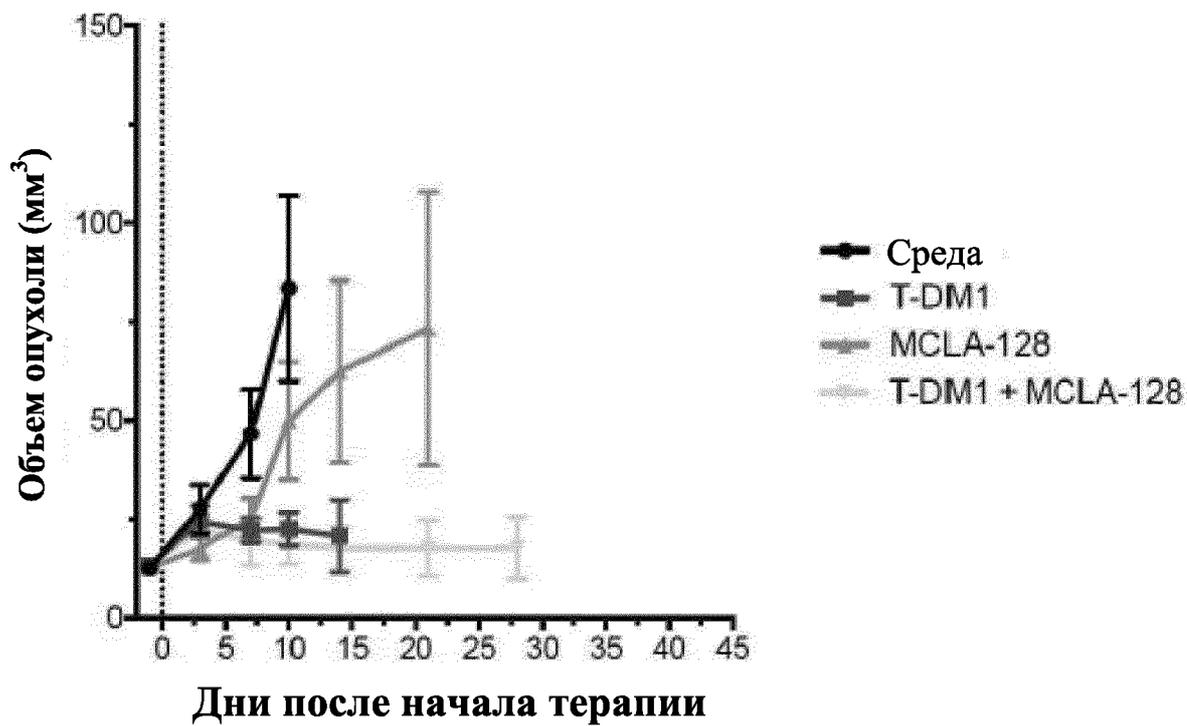
**Фигура 41**

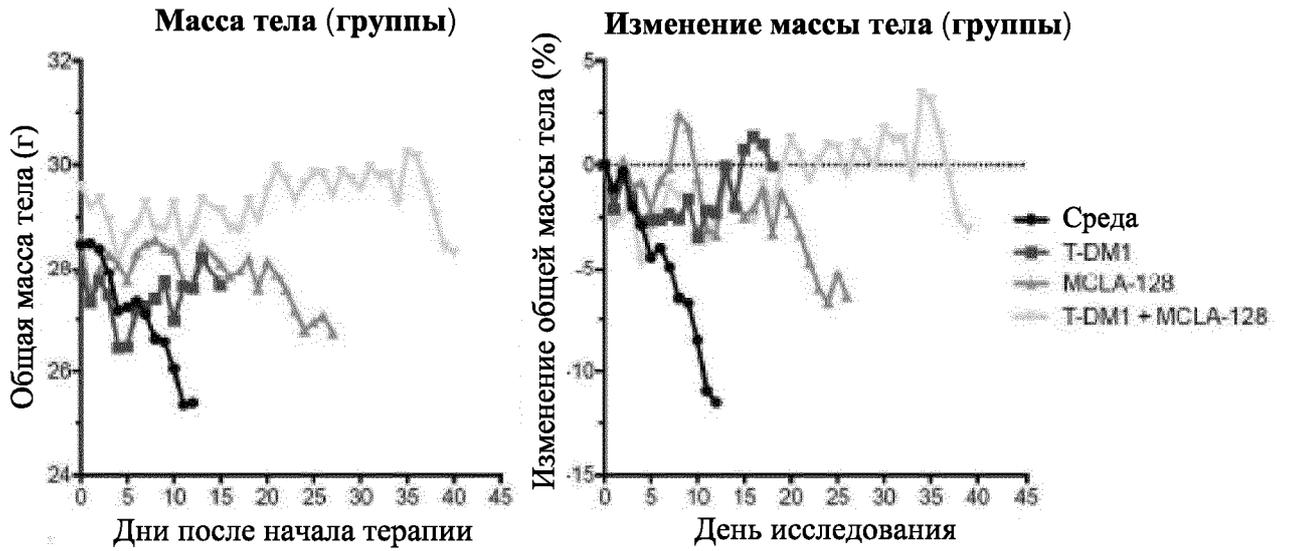


**Фигура 42**

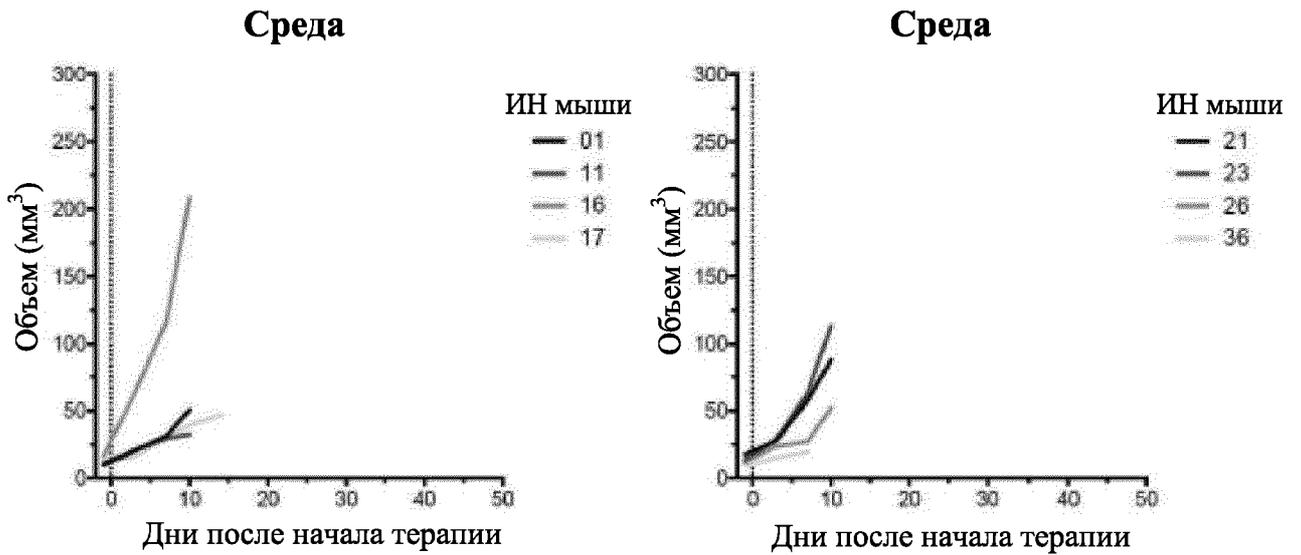


Фигура 43

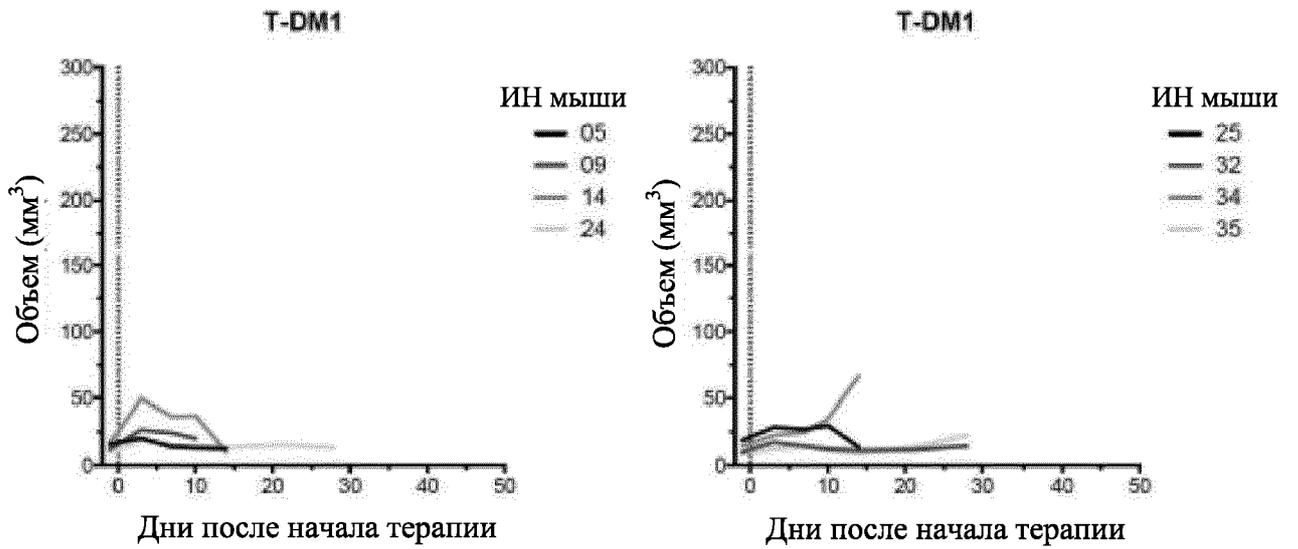
**Объем опухоли****Фигура 44**



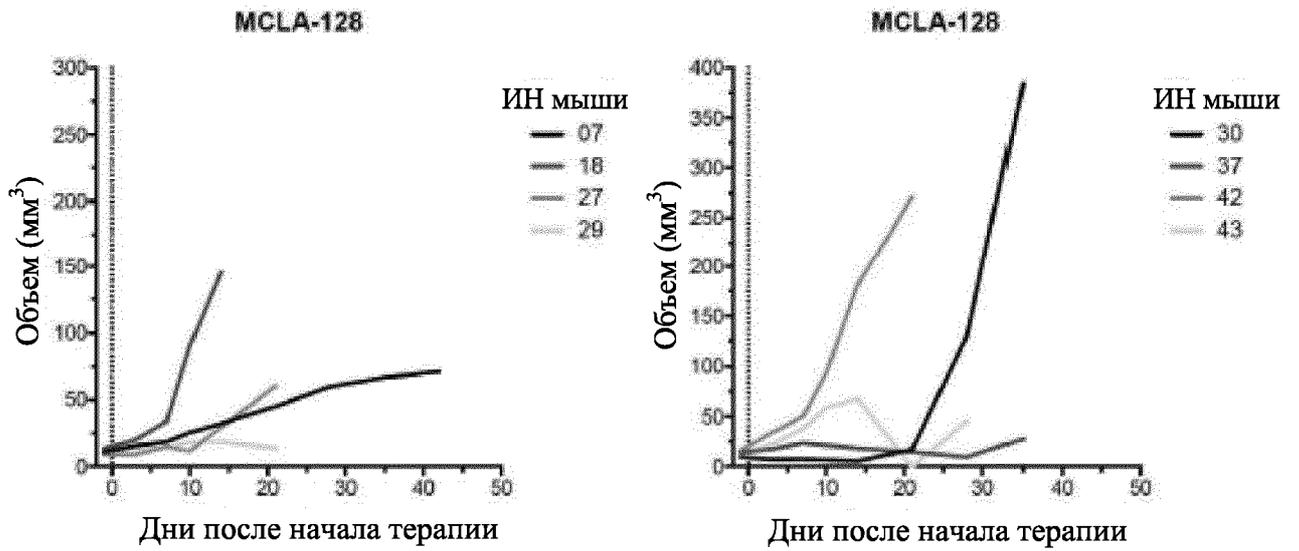
**Фигура 45**



**Фигура 46**

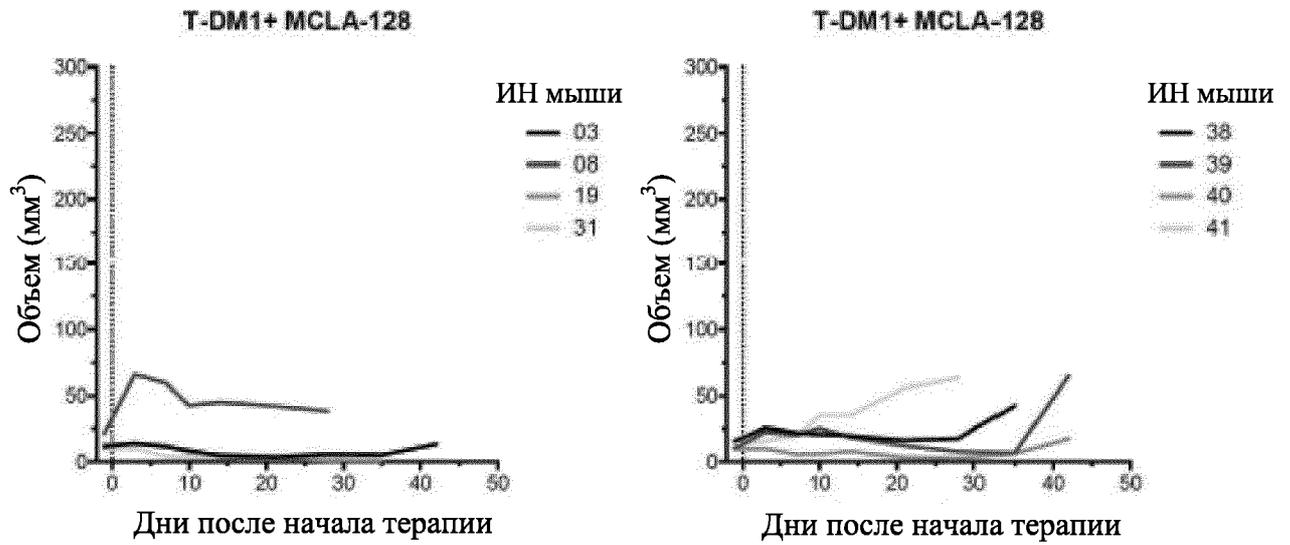


**Фигура 47**



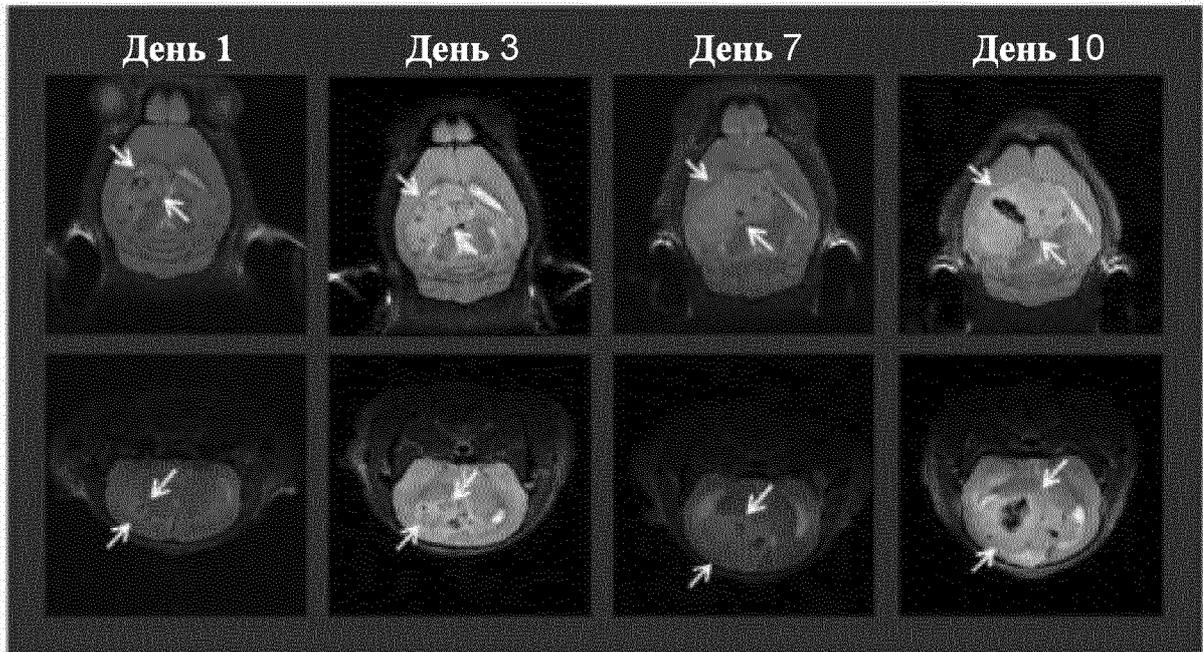
**Фигура 48**

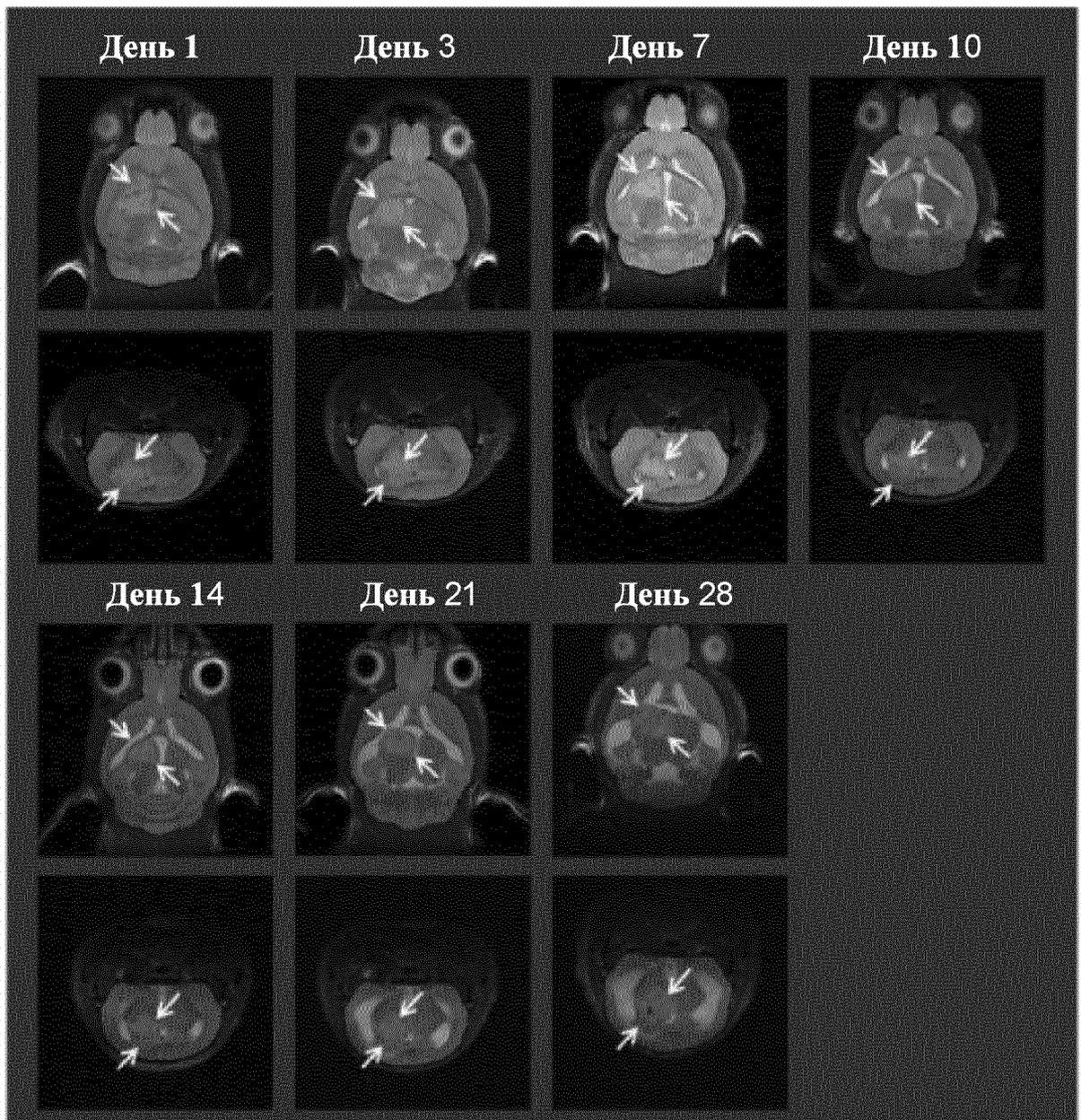
## Фигура 49



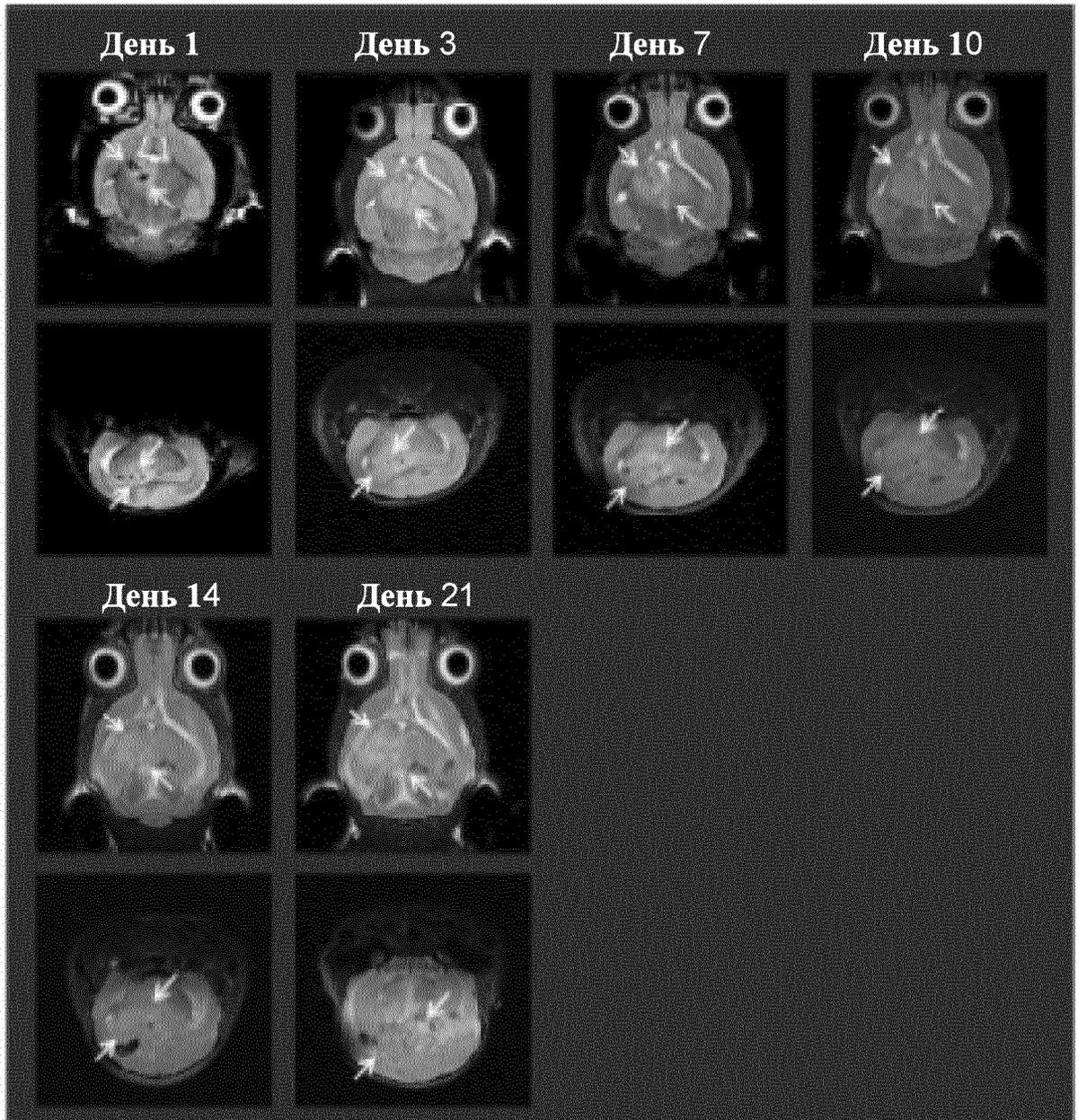
## Фигура 50

Группа А, М23

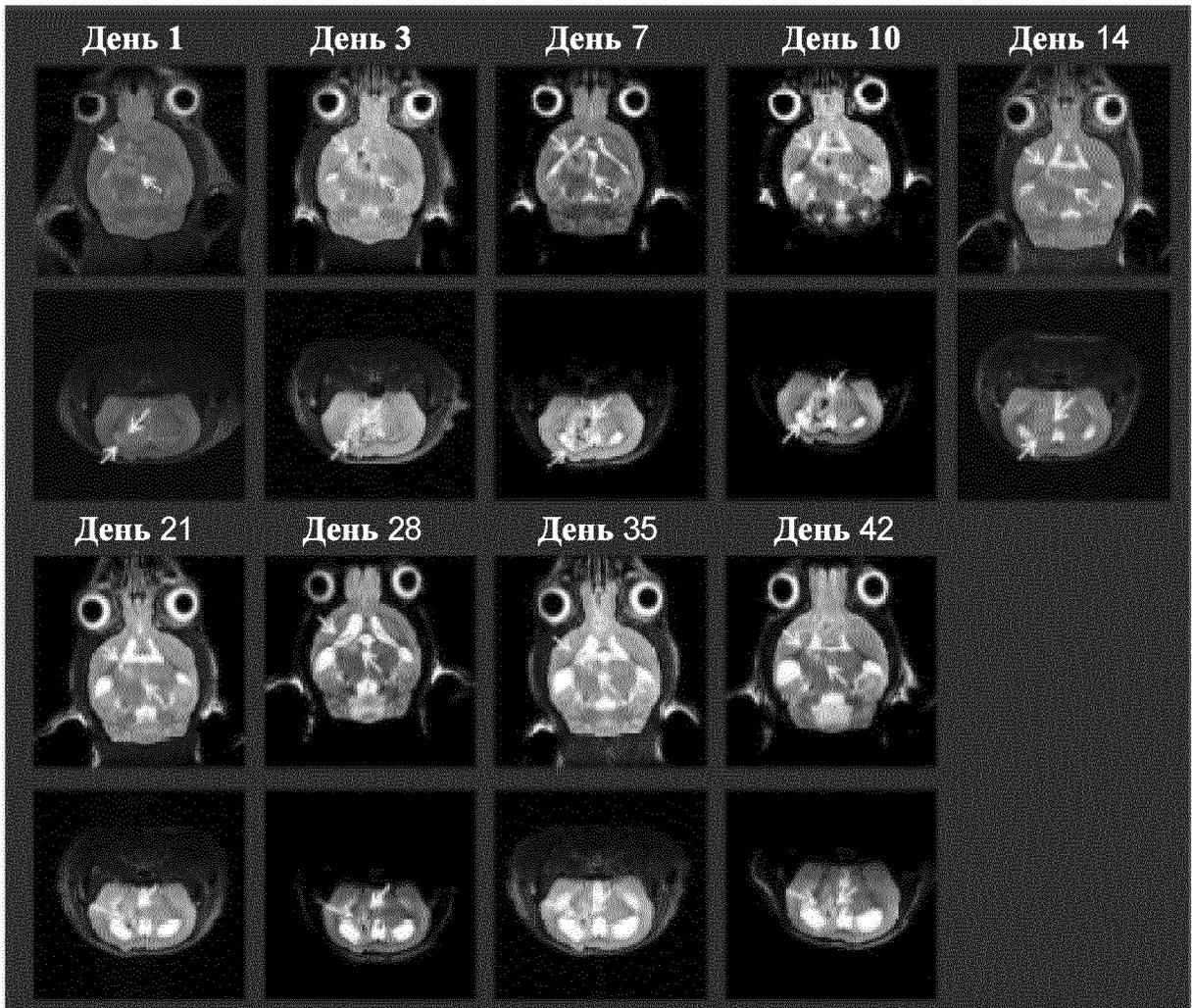




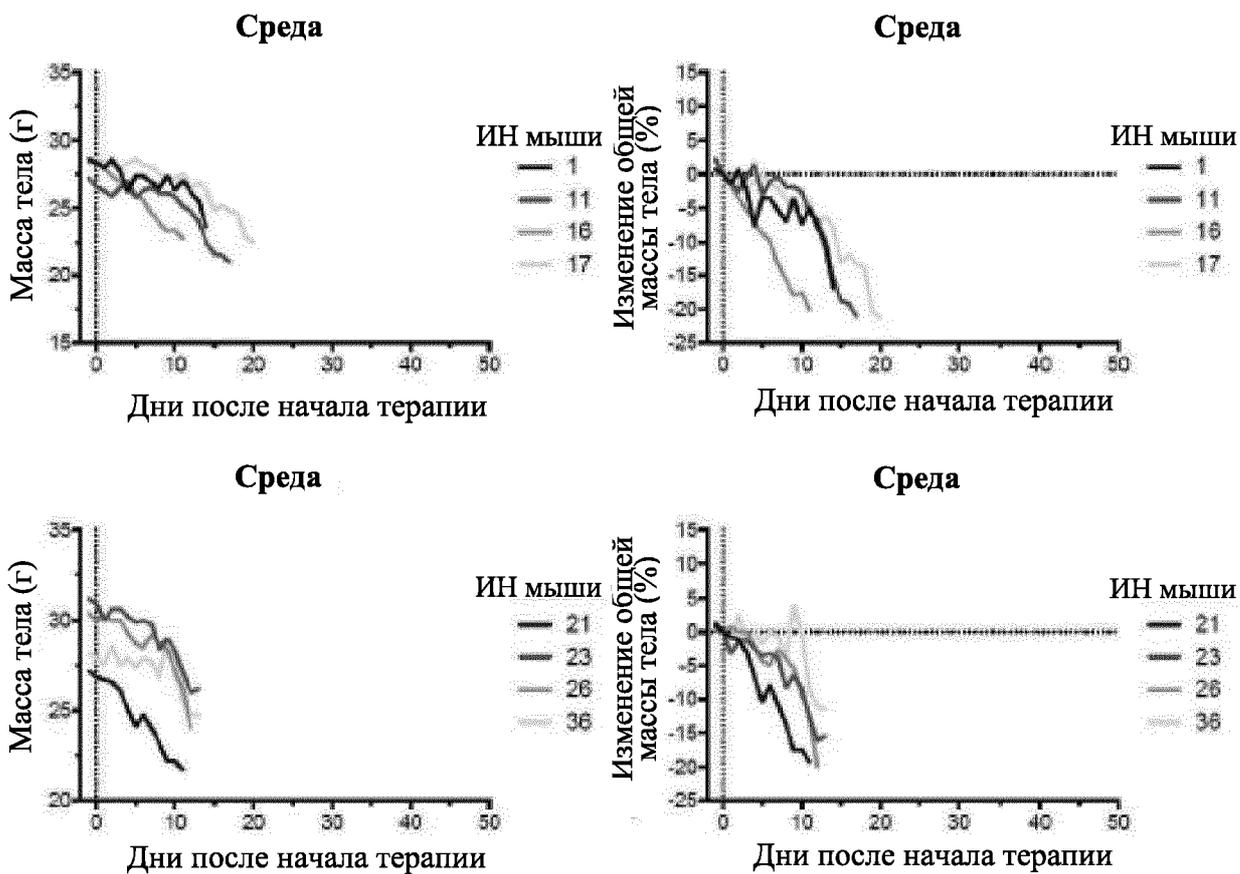
**Фигура 51**



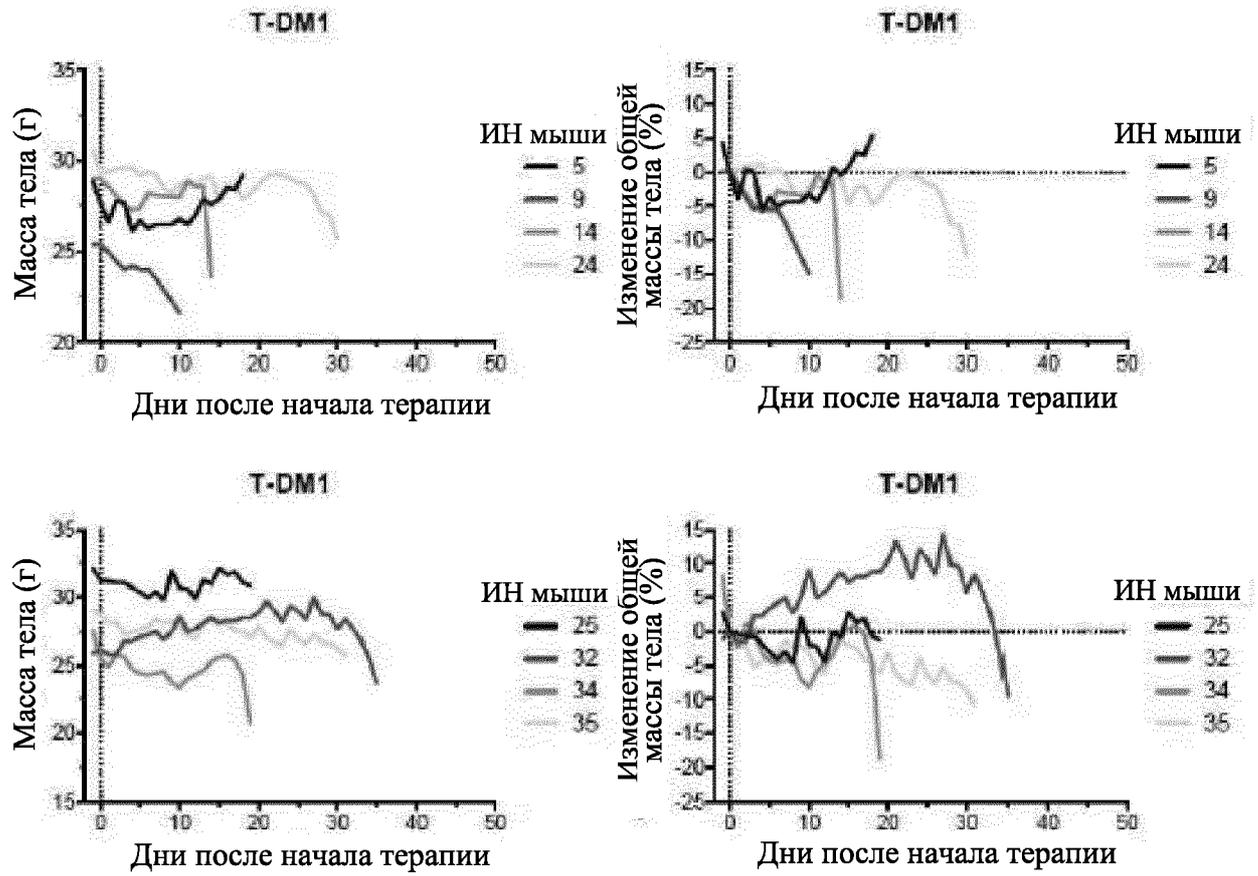
**Фигура 52**



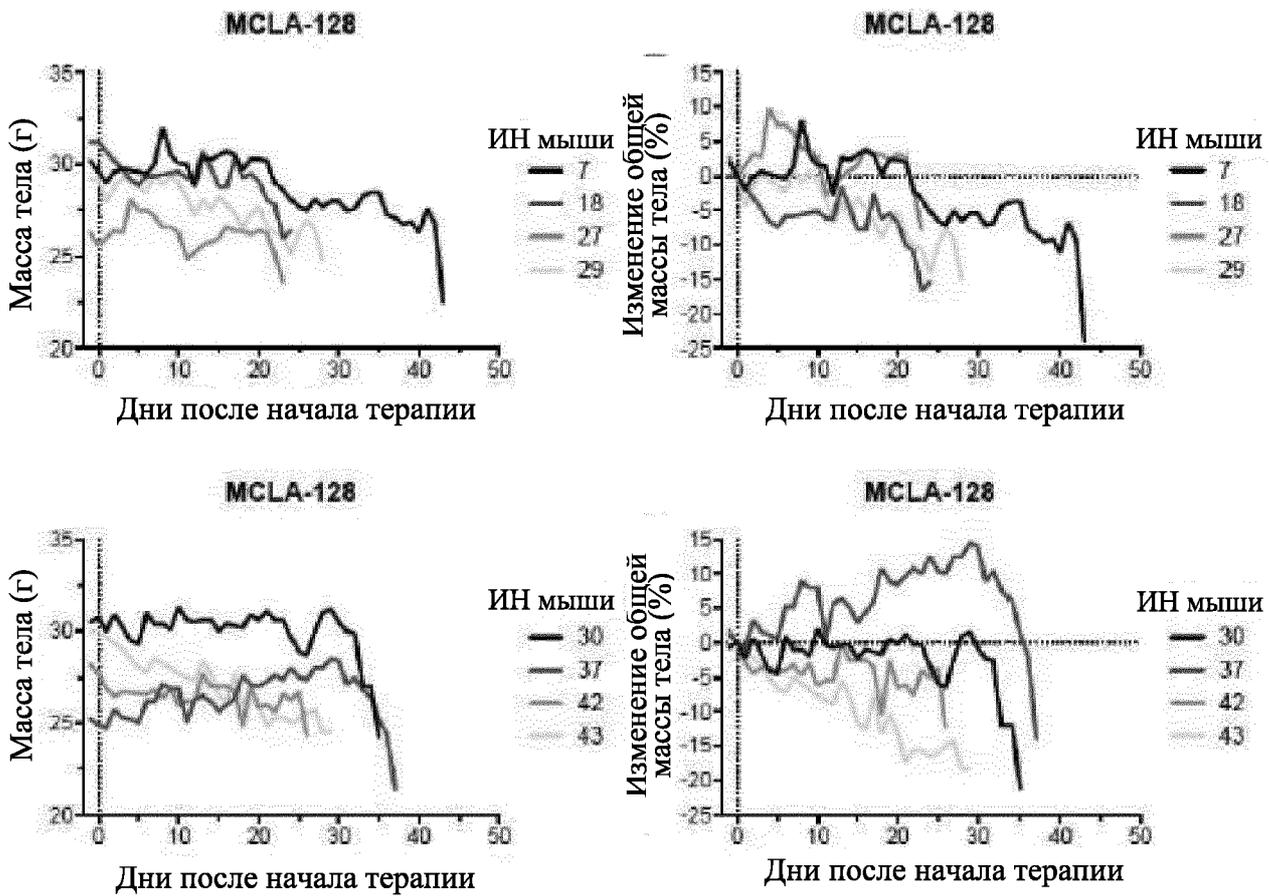
**Фигура 53**



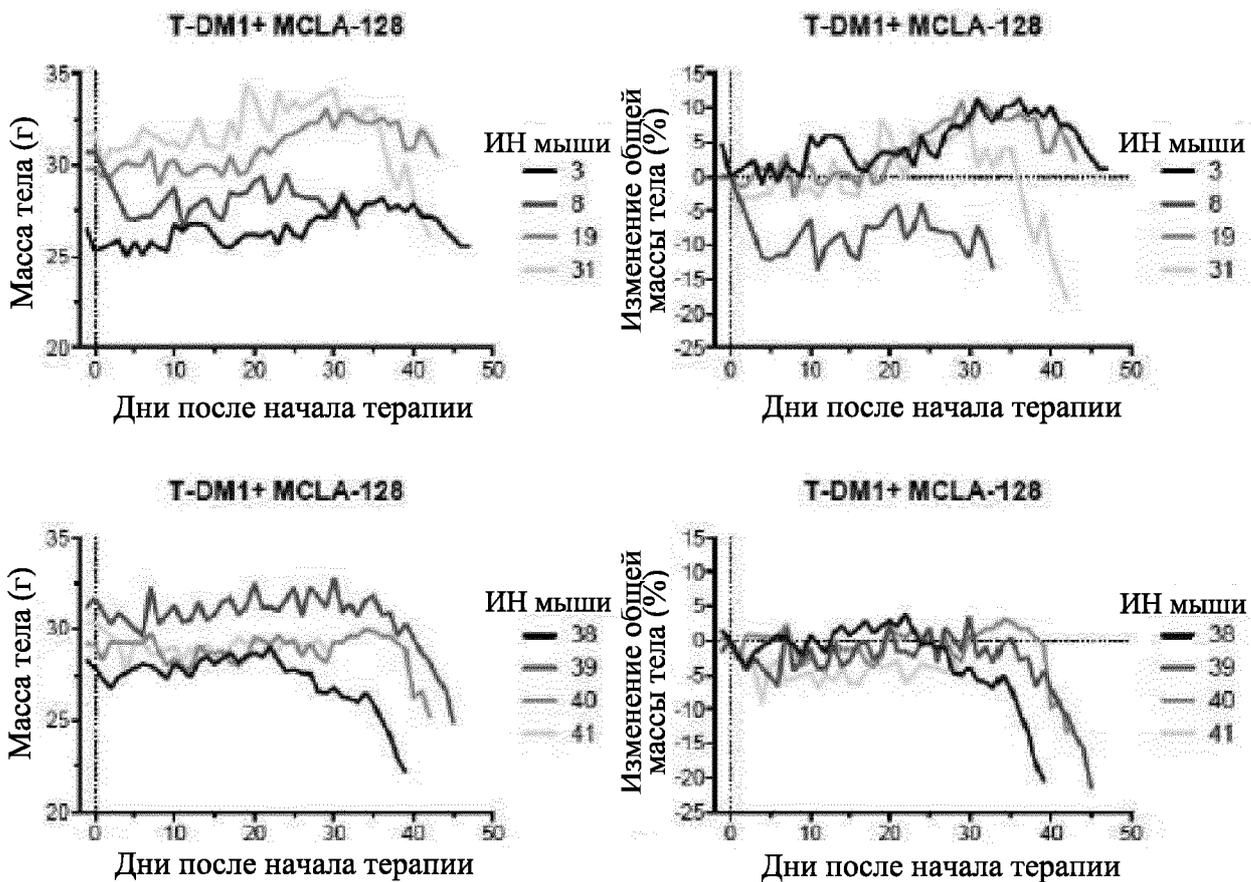
Фигура 54



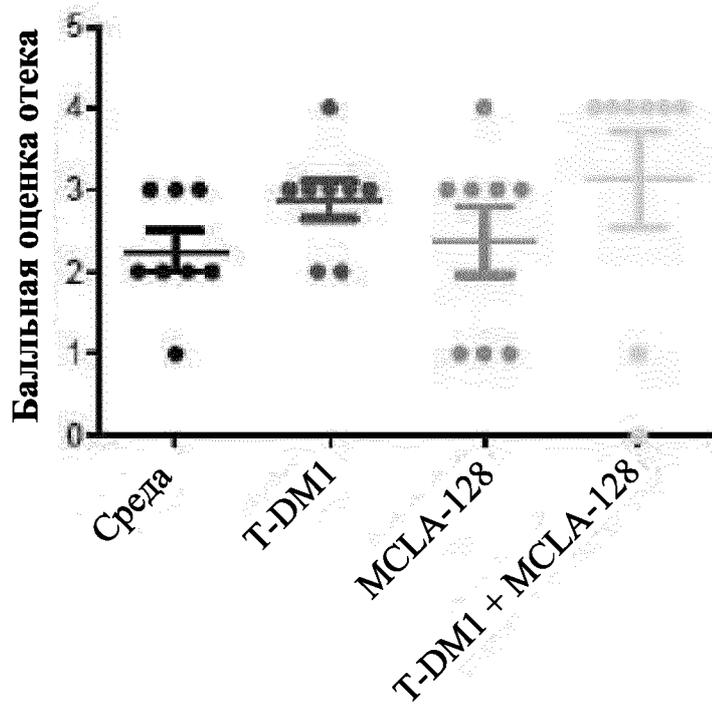
**Фигура 55**



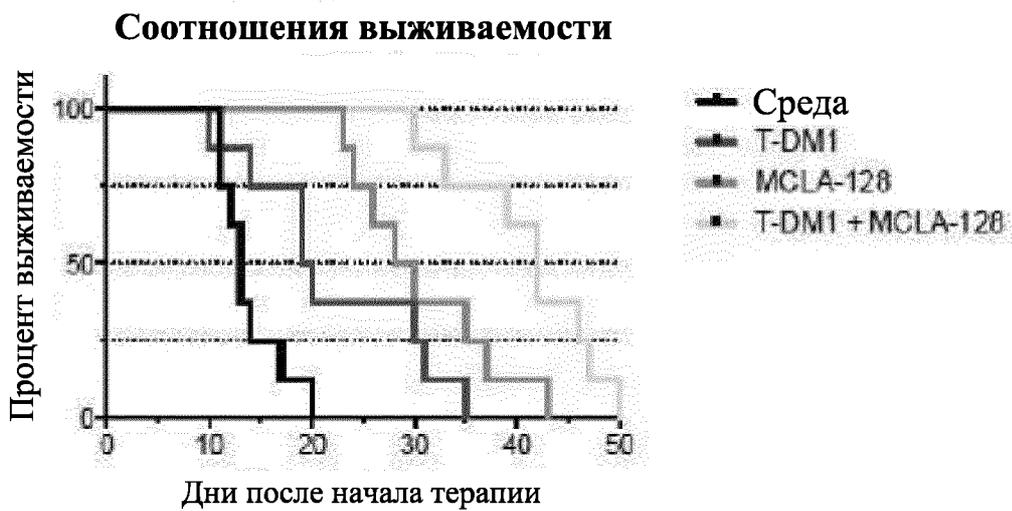
**Фигура 56**



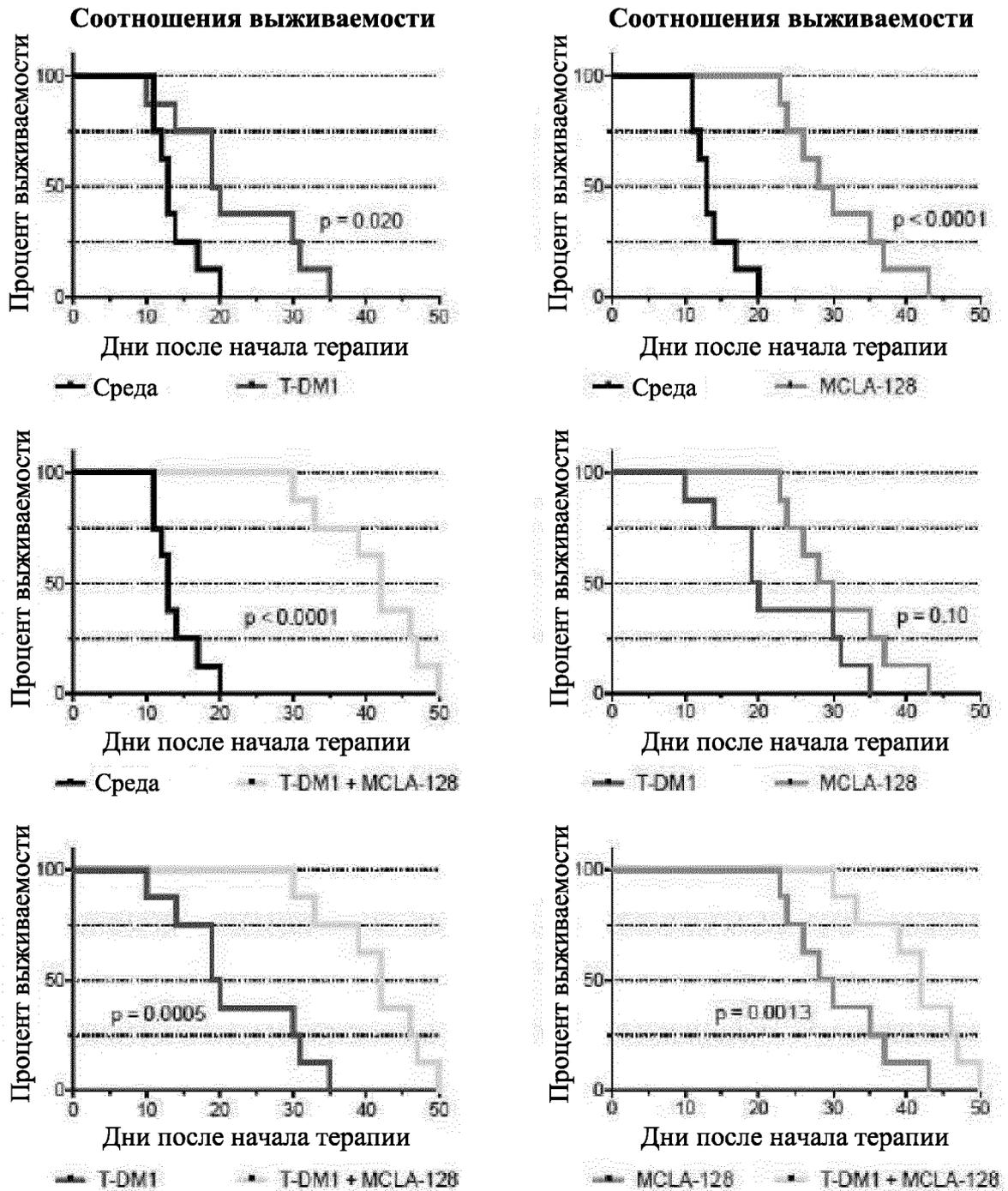
Фигура 57



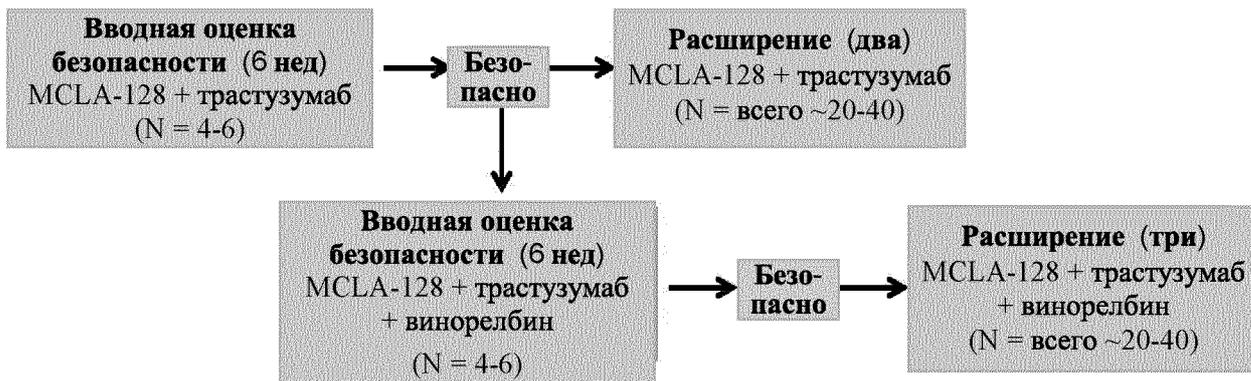
**Фигура 58**



**Фигура 59**



Фигура 60

**Фигура 61**

**Вводная оценка безопасности**

<b>Цикл 1, день 1</b>		
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в*	
<b>День 2</b>		
		Трастузумаб 8 мг/кг 90 мин в/в*
<b>Цикл ≥ 2, день 1 (раз в 3 нед)</b>		
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин Трастузумаб 6 мг/кг 30-90м в/в*

\* С последующим 6-часовым периодом наблюдения после начала инфузии первичной дозы и 2-часовым периодом для всех последующих введений.

В цикле 2 трастузумаб нужно было вводить в течение 90 мин.

**Расширение**

<b>Цикл 1, день 1 (раз в 3 нед)</b>		
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин Трастузумаб 8 мг/кг 90 мин в/в*
<b>Цикл ≥ 2, день 1 (раз в 3 нед)</b>		
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в*	30 мин Трастузумаб 6 мг/кг 30-90м в/в*

\* С последующим 6-часовым периодом наблюдения после начала инфузии первичной дозы и 2-часовым периодом для всех последующих введений.

В цикле 2 трастузумаб нужно было вводить в течение 90 мин.

**Фигура 62**

### Вводная оценка безопасности

Цикл 1, день 1					День 2	День 9
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин	Трастузумаб 8 мг/кг 90 мин в/в*		Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в	Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в
Цикл ≥ 2, день 1 (раз в 3 нед)						День 8
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин	Трастузумаб 6 мг/кг 30-90м в/в*	30 мин	Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в	Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в

\* С последующим 6-часовым периодом наблюдения после начала инфузии первичной дозы и 2-часовым периодом для всех последующих введений.

В цикле 2 трастузумаб нужно было вводить в течение 90 мин.

### Расширение

Цикл 1, день 1 (раз в 3 нед)					День 8
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин	Трастузумаб 8 мг/кг 90 мин в/в*	30 мин	Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в
Цикл ≥ 2, день 1 (раз в 3 нед)					День 8
Премедикация	MCLA-128 750 мг 2 ч в/в	30 мин	Трастузумаб 6 мг/кг 30-90м в/в*	30 мин	Винорелбин 25 мг/м <sup>2</sup> 10 мин в/в

\* С последующим 6-часовым периодом наблюдения после начала инфузии первичной дозы и 2-часовым периодом для всех последующих введений.

В цикле 2 трастузумаб нужно было вводить в течение 90 мин.

Фигура 63