

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992522 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.22

(22) Дата подачи заявки
2018.05.17

(51) Int. Cl. C07K 16/32 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА К ErbB-2/ErbB-3 С
ЭНДОКРИННОЙ ТЕРАПИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) 62/507,675
(32) 2017.05.17
(33) US
(86) PCT/NL2018/050329
(87) WO 2018/212656 2018.11.22
(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Моссан-Детай Давид Андре Батист,
Гёин Сесилия Анна Вильгельмина
(NL)
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, комбинации терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3; а также к средствам для применения в указанном способе.

A1

201992522

201992522

A1

КОМБИНАЦИЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА К ERBB-2/ERBB-3 С ЭНДОКРИННОЙ ТЕРАПИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке США № 62/507675,
5 поданной 17 мая 2017 г., содержание которой настоящим включено посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к
области терапевтических (человеческих) антител для лечения заболеваний, связанных с
аберрантными клетками. Более конкретно, оно относится к антителам, которые могут
связывать ErbB-2 и ErbB-3, и к лечению субъектов с раком молочной железы с
10 применением этих антител в комбинации с лекарственным средством для эндокринной
терапии.

Гормоны в крови влияют на некоторые типы рака молочной железы. Клетки рака
молочной железы, положительные по рецептору эстрогена (ER) и рецептору прогестерона
(PR), имеют рецепторы, которые связываются с гормонами, стимулирующими их
15 размножение. Примерно 2 из 3 случаев рака молочной железы являются положительными
по рецептору гормона. Клетки таких видов рака имеют рецепторы, которые связываются с
гормонами эстрогеном (ER-положительные виды рака) и/или прогестероном (PR-
положительные виды рака). При этих видах рака высокий уровень эстрогена стимулирует
размножение и распространение раковых клеток.

20 Существуют различные лекарственные средства, которые препятствуют этому
механизму.

Лекарственные средства, которые блокируют рецепторы эстрогенов

Эти лекарственные средства препятствуют влиянию эстрогена на клетки рака
молочной железы. Примером такого лекарственного средства является тамоксифен.
25 Указанное лекарственное средство блокирует рецепторы эстрогенов в клетках рака
молочной железы. Это препятствует связыванию эстрогена с раковыми клетками и
передаче им сигнала к размножению и делению. Несмотря на то, что тамоксифен
действует как антиэстроген в клетках молочной железы, он действует как эстроген в
других тканях, таких как матка и кости. Вследствие этого его называют селективным
30 модулятором рецепторов эстрогенов (SERM). Тамоксифен является одним из самых
известных SERM. Другие SERM, которые были одобрены для медицинского применения,
включают базедоксифен (дуави (Duavee)), бропарестрол (акнестрол (Acnestrol)), кломифен
(кломид (Clomid)), циклофенил (сексовид (Sexovid)), лазофоксифен (фаблин (Fablyn)),
ормелоксифен (центрон (Centron)), новекс (Novex), новекс-DS (Novex-DS), севиста
35 (Sevista)), оспемифен (осфена (Osphena)), ралоксифен (эвиста (Evista)), тамоксифен

(нолвадекс (Nolvadex)) и торемифен (фарестон (Fareston)), некоторые из которых были одобрены для лечения рака молочной железы, положительного по рецептору гормона. Многие другие SERM не были (еще) одобрены, но также являются функциональными.

5 Прием тамоксифена можно начинать как после операции (адьювантная терапия), так и до операции (неоадьювантная терапия) и обычно прием длится в течение 5-10 лет. После менопаузы можно применять ингибиторы ароматазы.

У женщин с высоким риском развития рака молочной железы тамоксифен можно применять для снижения риска развития рака молочной железы.

10 Торемифен (фарестон) представляет собой другой SERM, одобренный в настоящее время для лечения метастатического рака молочной железы. Эти лекарственные средства в основном принимают перорально, чаще всего в виде пилюль.

Фулвестрант (фазлодекс)

15 Фулвестрант представляет собой лекарственное средство, которое блокирует рецепторы эстрогенов, а также временно устраняет их. Фулвестрант является селективным разрушителем рецепторов эстрогенов (SERD). Другие SERD включают бриланэстрант (Brilanestrant) и элацэстрант (Elacestrant). Фулвестрант применяют для лечения метастатического рака молочной железы, в том числе после прекращения действия других гормональных лекарственных средств (таких как тамоксифен и часто ингибитор ароматазы).

20 Он может быть введен с помощью внутримышечной инъекции. В настоящее время фулвестрант одобрен для применения у женщин в постменопаузе.

Ингибиторы ароматазы (ИА)

25 Ингибиторы ароматазы (ИА) представляют собой лекарственные средства, которые останавливают выработку эстрогена. До менопаузы большая часть эстрогена вырабатывается яичниками. Однако у женщин, яичники которых больше не работают, будь то из-за менопаузы или медикаментозных способов лечения, небольшое количество эстрогена все еще вырабатывается ферментом (называемым ароматазой) в жировой ткани, груди или коже. Как представляется, ИА действуют путем блокирования выработки эстрогена ароматазой.

30 Эти лекарственные средства применяют у женщин в постменопаузе, несмотря на то, что их также можно применять у женщин в пременопаузе в комбинации с абляцией яичников.

Существуют различные ИА. Примерные ИА включают: летрозол (фемара (Femara)); анастрозол (аримидекс (Arimidex)) и экземестан (аромазин (Aromasin)).

Эти лекарственные средства представляют собой пилюли, которые можно принимать ежедневно.

Для женщин в постменопаузе, имеющих виды рака, положительного по рецептору гормона, врачи могут рекомендовать прием ИА во время адъювантной терапии.

5 Аналоги рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (РФЛГ): эти лекарственные средства применяют более часто, чем овариэктомию. Как представляется, они останавливают сигнал, который организм посылает яичникам для выработки эстрогена, что вызывает временную менопаузу. Обычные лекарственные средства РФЛГ включают гозерелин (золадекс (Zoladex)) и лейпролид (лупрон (Lupron)). Их можно применять по
10 отдельности или вместе с другими гормональными лекарственными средствами (тамоксифеном, ингибиторами ароматазы, фулвестрантом) в качестве гормональной терапии у женщин в пременопаузе.

Химиотерапевтические лекарственные средства: некоторые химиотерапевтические лекарственные средства могут повредить яичники женщин в пременопаузе, в результате
15 этого они больше не вырабатывают эстроген. У некоторых женщин функция яичников восстанавливается спустя месяцы или годы, но у других повреждение яичников является постоянным и приводит к менопаузе.

Лекарственные средства, упомянутые выше, в совокупности называют лекарственными средствами для эндокринной терапии рака молочной железы.
20 Эндокринная терапия и сопутствующие лекарственные средства недавно были рассмотрены Lumachi et al (Lumachi, F., et al. «Endocrine therapy of breast cancer.» Current medicinal chemistry 18.4 (2011): 513-522). Применительно к настоящему изобретению лекарственные средства для эндокринной терапии представляют собой лекарственные средства, которые применяют для эндокринной терапии рака молочной железы.

25 Применительно к настоящему изобретению, описанному в настоящем документе, термин эндокринная терапия включает терапевтические лекарственные средства, которые препятствуют действию гормона, как правило, гормона эстрогена или прогестерона в раковой клетке. Это может быть обусловлено непосредственным действием лекарственного средства в раковой клетке или косвенным, например, путем уменьшения
30 количества эстрогена, которое может достигать раковой клетки, включая нарушение, непосредственное или косвенное, действия эстрогена на опухоль.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного
35 рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, комбинации

терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению предложена комбинация биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и лекарственного средства для эндокринной терапии для применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и лекарственного средства для эндокринной терапии при изготовлении лекарственного средства для применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению также предложен продукт, содержащий биспецифическое антитело к ErbB-2/ErbB-3 и лекарственное средство для эндокринной терапии для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела, которое может связывать внеклеточную часть ErbB-2 и которое ингибирует димеризацию ErbB-2/ErbB-3 на раковой клетке, причем указанный рак представляет собой рак, положительный по рецептору гормона.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть ErbB-2 и которое ингибирует димеризацию ErbB-2/ErbB-3 на раковой клетке, для применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной

железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанный рак представляет собой рак, положительный по рецептору гормона.

Согласно настоящему изобретению также предложена комбинация антитела к ErbB-2 и/или ErbB-3 и лекарственного средства для эндокринной терапии для применения при
5 лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, и при этом указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2, ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела к ErbB-2 и/или ErbB-3 и лекарственного средства для эндокринной терапии при изготовлении
10 лекарственного средства для применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, и при этом указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2,
15 ErbB-3.

Согласно настоящему изобретению также предложен продукт, содержащий антитело к ErbB-2 и/или ErbB-3 и лекарственное средство для эндокринной терапии, для
одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного
20 рака, причем указанный рак представляет собой рак, положительный по рецептору гормона, и при этом указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2, ErbB-3.

Антитело предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, которое имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.
25 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии субъекту, нуждающемуся в этом.

Антитело может представлять собой MCLA-128.

Лекарственное средство для эндокринной терапии предпочтительно представляет
30 собой лекарственное средство, который препятствует действию гормона эстрогена или прогестерона в раковой клетке. Лекарственное средство для эндокринной терапии предпочтительно содержит ингибитор ароматазы; селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM); или селективный подавитель рецептора эстрогена (SERD). Лекарственное средство для эндокринной терапии может содержать селективный
35 модулятор рецептора эстрогена (SERM), выбранный из группы, состоящей из

тамоксифена (нолвадекса), бромпарестрола (акнестрола), циклофенила (сексовида), ралоксифена (эвиста) и торемифена (фарестона). Лекарственное средство для эндокринной терапии предпочтительно содержит тамоксифен, фулвестрант или его эквивалент. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

5 лекарственное средство для эндокринной терапии содержит летрозол или его эквивалент.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак представляет собой иммуногистохимический ErbB-2+ рак или иммуногистохимический ErbB-2++ рак без амплификации гена ErbB-2.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной
10 железы представляет собой ER-положительный метастатический рак молочной железы (мРМЖ) с низкой экспрессией HER2 мРМЖ ИГХ 1+ или ИГХ 2+ в комбинации с отрицательным результатом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение пациенту ингибитора циклинзависимой киназы 4/6.

15 Ингибитор циклинзависимой киназы 4/6 может представлять собой, например, палбоциклиб, рибоциклиб или абемациклиб.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект, страдающий от рака молочной железы или подверженный риску развития указанного рака, включая субъектов с риском рецидива, представляет собой субъекта, который
20 получил 1 и предпочтительно 2 варианта эндокринной терапии до начала лечения с применением биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3, описанного в настоящем документе. Субъект предпочтительно получил эти предшествующие варианты терапии для лечения метастазирования. Субъект предпочтительно также получил ингибитор циклинзависимой киназы до начала лечения с применением биспецифического антитела к
25 ErbB-2/ErbB-3, описанного в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биспецифические антитела к ErbB-2/ErbB-3 описаны в заявке PCT/NL2015/050125, опубликованной как WO2015/130173. Эта заявка включена в настоящий документ посредством ссылки. В частности, это относится к молекулам нуклеиновой кислоты,
30 молекулам аминокислот и последовательностям, кодирующим такое биспецифическое антитело или его константные или переменные части. Указанная заявка также конкретно упоминается (а также ссылки, содержащиеся в ней) в части получения такого биспецифического антитела.

В EP17164292; EP17164382 и US 15/476260 также описаны биспецифические антитела к ErbB-2/ErbB-3 и их применение. EP17164292; EP17164382 и US 15/476260 включены в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору эстрогена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору прогестерона. Разные виды рака молочной железы обычно тестируют на наличие упомянутых рецепторов гормонов, и специалистам в данной области техники доступны общепринятые классификации и тесты. См. Hammond et al (2010: J. of Clinical Oncology Vol 28:pp 2784-2794), в которой описаны подходящие тесты и, соответственно, предоставлены рекомендации. Например, пациент, подходящий для лечения в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой пациента, у которого по меньшей мере 1% ядер опухоли, например, при биопсии опухоли, являются иммунореактивными; положительными по рецептору эстрогена и/или рецептору прогестерона, согласно результатам определения иммуногистохимическим методом.

Кроме того, другим примером пациента, подходящего для лечения в соответствии с настоящим изобретением, является пациент, страдающий от рака с подтвержденным положительным статусом по рецептору гормона (положительный по рецептору эстрогена [ER+] и/или положительный по рецептору прогестерона [PR+]), включая $\geq 1\%$ положительно окрашенных клеток согласно местным стандартам, на основании местного анализа самой последней биопсии опухоли.

Кроме того, другим примером пациента, подходящего для лечения в соответствии с настоящим изобретением, является пациент, имеющий рак с подтвержденным положительным статусом по рецептору гормона (положительный по рецептору эстрогена [ER+] и/или положительный по рецептору прогестерона [PR+]) для $\geq 1\%$ положительных клеток, согласно результату определения иммуногистохимическим методом на биопсии опухоли.

Рак молочной железы может быть ErbB-2-отрицательным или ErbB-2-положительным. Wolff et al (2013: J. of Clinical Oncology Vol 31: pp 3997-4013) описали такие тесты и предоставили рекомендации. Общепринятой стратификацией рака молочной железы на основании экспрессии ErbB-2 является ErbB-2-; ErbB-2+; ErbB-2++

без амплификации гена ErbB-2; ErbB-2++ с амплификацией гена ErbB-2 и ErbB-2+++. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной железы представляет собой ErbB-2+ рак молочной железы или ErbB-2++ рак молочной железы без амплификации гена ErbB-2, который включает отсутствие амплификации гена на уровне детектирования. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) можно применять для определения наличия или отсутствия амплификации гена. Соответственно, пациентом, подходящим для лечения в соответствии с настоящим изобретением, может быть пациент, имеющий рак без признаков амплификации гена ErbB-2 в соответствии с анализом FISH, который понимается обычным специалистом в данной области техники как FISH-отрицательный.

Пациентом, подходящим для лечения в соответствии с настоящим изобретением, может быть пациент, который имеет ER-положительный метастатический рак молочной железы (МРМЖ) с низкой экспрессией HER2 (иммуногистохимия (ИГХ) 1+ или ИГХ 2+ в комбинации с отрицательным результатом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения рак молочной железы представляет собой ErbB-3-положительный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифическое антитело может снижать индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке.

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий сайт» относится к сайту, происходящему и предпочтительно присутствующему на антителе, который способен связываться с антигеном. Немодифицированный антигенсвязывающий сайт, как правило, образован вариабельным доменом антитела и присутствует в нем. Вариабельный домен содержит указанный антигенсвязывающий сайт. Вариабельный домен, который связывает антиген, представляет собой вариабельный домен, содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывает антиген.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариабельный домен антитела согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). Антигенсвязывающий сайт может присутствовать в комбинированном вариабельном домене VH/VL или только в области VH, или только в области VL. Если антигенсвязывающий сайт присутствует только в одной из двух областей вариабельного домена, партнерская вариабельная область может способствовать складыванию и/или стабильности связывающей вариабельной области, но сама не вносит значительный вклад в связывание антигена.

В настоящем документе «связывание антигена» относится к типичной способности антитела связываться с его антигеном. Антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывается с ErbB-3, связывается с ErbB-3 и, при прочих равных условиях, не связывается с гомологичными рецепторами ErbB-1 и ErbB-4 этого же вида. Учитывая, что семейство ErbB представляет собой семейство рецепторов клеточной поверхности, связывание, как правило, оценивают на клетках, которые экспрессируют рецептор (ы). Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно связывает человеческий ErbB-2, человеческий ErbB-3 или их комбинацию.

Связывание антигена антителом, как правило, опосредуется за счет областей комплементарности антитела и специфической трехмерной структуры как антигена, так и переменного домена, что позволяет этим двум структурам точно связываться друг с другом (взаимодействие, сходное с замком и ключом), в отличие от случайного, неспецифического прилипания антител. Поскольку антитело, как правило, распознает эпитоп антигена, и как таковой эпитоп может присутствовать и в других соединениях, антитела согласно настоящему изобретению, которые связывают ErbB-2 и/или ErbB-3, могут также распознавать другие белки, если эти другие соединения содержат тот же эпитоп. Следовательно, термин «связывание» не исключает связывание антител с другим белком или белком (белками), который (ые) содержит (ат) тот же эпитоп. Такой (ие) другой (ие) белок (белки) предпочтительно не является (являются) человеческим белком. Антигенсвязывающий сайт для ErbB-2 и антигенсвязывающий сайт для ErbB-3, определенные в настоящем изобретении, как правило, не связываются с другими белками на мембране клеток у постнатального, предпочтительно взрослого человека. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, как правило, способно связывать ErbB-2 или ErbB-3 с аффинностью связывания по меньшей мере 1×10^{-6} М, как более подробно описано ниже.

В настоящем документе термин «препятствует связыванию» означает, что антитело направлено к эпитопу на ErbB-3, и антитело конкурирует с лигандом за связывание с ErbB-3. Антитело может уменьшать связывание лиганда, замещать лиганд, когда он уже связан с ErbB-3, или оно может, например, за счет стерического затруднения, по меньшей мере частично предотвращать связывание этого лиганда с ErbB-3.

В настоящем документе термин «антитело» означает белковую молекулу, предпочтительно относящуюся к иммуноглобулиновому классу белков, содержащую один или более переменных доменов, которые связывают эпитоп на антигене, причем такие домены происходят из переменного домена антитела или гомологичны его последовательности. Антитела для терапевтического применения предпочтительно

максимально возможно близки к природным антителам субъекта, которого нужно лечить (например, человеческие антитела для субъектов-людей). Связывание антитела может быть выражено в терминах специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфично связан связывающим доменом. Аффинность является мерой силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Специфичное связывание определяется как связывание с величинами аффинности (KD) по меньшей мере 1×10^{-6} М, более предпочтительно 1×10^{-7} М, более предпочтительно более 1×10^{-9} М. Как правило, антитела для терапевтического применения имеют величины аффинности до 1×10^{-10} М или выше. Антитела, такие как биспецифические антитела согласно настоящему изобретению, могут содержать константные домены (часть Fc) природного антитела. Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело, предпочтительно подкласса человеческого IgG. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению относится к подклассу человеческого IgG1. Такие антитела согласно настоящему изобретению имеют хорошие свойства антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), имеют благоприятный период полужизни при введении *in vivo* человеку, и существует технология модификации СН3, которая может обеспечить модифицированные тяжелые цепи, которые предпочтительно образуют гетеродимеры в сравнении с гомодимерами при совместной экспрессии в клональных клетках.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой «полноразмерное» антитело. Термин «полноразмерное» в соответствии с настоящим изобретением определяется как включающий по существу полное антитело, которое, однако, не обязательно имеет все функции интактного антитела. Во избежание сомнений, полноразмерное антитело содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константные (C) и переменные (V) области, которые можно разделить на домены, обозначенные СН1, СН2, СН3, VH и CL, VL. Антитело связывается с антигеном за счет переменных доменов, содержащихся в части Fab, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы за счет константных доменов, в основном за счет части Fc. Термины «переменный домен», «пара VH/VL», «VH/VL» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Полноразмерные антитела согласно настоящему изобретению охватывают антитела, в которых могут присутствовать мутации, которые обеспечивают желательные характеристики. Такие мутации не должны представлять собой делеции существенных частей любой из областей. Однако антитела, в которых удален один или более аминокислотных остатков, без существенного изменения характеристик связывания полученного антитела, включены в

термин «полноразмерное антитело». Например, антитело IgG может иметь 1-20 вставок, делеций или комбинаций остатков аминокислот в константной области. Например, активность АЗКЦ антитела может быть улучшена, если само антитело обладает низкой активностью АЗКЦ, путем незначительной модификации константной области антитела (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).

Полноразмерные антитела IgG являются предпочтительными из-за их благоприятного периода полужизни и необходимости оставаться максимально сходными с полностью аутологичными (человеческими) молекулами по причинам иммуногенности. Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело IgG, предпочтительно биспецифическое полноразмерное антитело IgG1. IgG1 является предпочтительным благодаря его длительному периоду полужизни в кровотоке у человека. Для предотвращения какой-либо иммуногенности у человека предпочтительно, чтобы биспецифическое антитело IgG согласно настоящему изобретению представляло собой человеческий IgG1.

Термин «биспецифический» (bs) означает, что одна часть антитела (как определено выше) связывается с одним эпитопом на антигене, тогда как вторая часть связывается с другим эпитопом. Другой эпитоп, как правило, присутствует на другом антигене. В соответствии с настоящим изобретением указанный первый и второй антигены фактически представляют собой два разных белка. Предпочтительное биспецифическое антитело представляет собой антитело, которое содержит части двух разных моноклональных антител и, следовательно, связывается с двумя разными типами антигена. Одно плечо биспецифического антитела, как правило, содержит переменный домен одного антитела, и другое плечо содержит переменный домен другого антитела. Переменные области тяжелой цепи биспецифического антитела согласно настоящему изобретению, как правило, 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 ассоциированы с одинаковой, или общей, легкой цепью, также называют биспецифическим антителом с общей легкой цепью. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, в котором оба плеча содержат общую легкую цепь.

Предпочтительные биспецифические антитела могут быть получены путем совместной экспрессии двух разных тяжелых цепей и общей легкой цепи в одной клетке.

При применении доменов СНЗ дикого типа совместная экспрессия двух разных тяжелых цепей и общей легкой цепи приведет к образованию трех разных молекул, АА, АВ и ВВ. Для повышения процента желательного биспецифического продукта (АВ) можно применять модификацию СНЗ, или, другими словами, можно применять тяжелые цепи с совместимыми доменами гетеродимеризации, как определено ниже.

В настоящем документе термин «совместимые домены гетеродимеризации» относится к белковым доменам, которые модифицированы так, что модифицированный домен А' предпочтительно будет образовывать гетеродимеры с модифицированным доменом В', и наоборот, при этом гомодимеризация между А'-А' и В'-В' уменьшена.

Термин «общая легкая цепь» в соответствии с настоящим изобретением относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотных последовательностях, в то время как специфичность связывания полноразмерного антитела не изменяется. Например, в объеме определения общих легких цепей, которое используется в настоящем документе, возможно получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но все еще функционально эквивалентны, например, путем введения и испытания консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не участвуют или вносят лишь частичный вклад в специфичность связывания при спаривании с тяжелой цепью и т.п. Все термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одионочная легкая цепь», «одионочная VL», с добавлением термина «перегруппированная» или без него, используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Одним из аспектов настоящего изобретения является применение в качестве общей легкой цепи человеческой легкой цепи, которая может объединяться с различными тяжелыми цепями с образованием антител с функциональными антигенсвязывающими доменами (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998 и Nissim et al. 1994). Предпочтительно общая легкая цепь имеет последовательность зародышевой линии. Предпочтительная последовательность зародышевой линии представляет собой вариабельную область легкой цепи, которая часто применяется в репертуаре человека и имеет хорошую термодинамическую стабильность, выход и растворимость. Предпочтительная легкая цепь зародышевой линии представляет собой O12, предпочтительно перегруппированную легкую каппа-цепь человеческой зародышевой линии IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или ее фрагмент, или функциональный эквивалент (т.е. тот же сегмент гена IgVκ1-39, но другой сегмент гена IGJκ) (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT во всемирной сети на imgt.org). Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанная общая легкая цепь

представляет собой легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно перегруппированную легкую каппа-цепь человеческой зародышевой линии, содержащую сегмент гена IgVK1-39, наиболее предпочтительно перегруппированную легкую каппа-цепь человеческой зародышевой линии gVK1-39*01/IGJK1*01. Термины

5 перегруппированная легкая каппа-цепь человеческой зародышевой линии IgVK1-39*01/IGJK1*01, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVK1-39 или, кратко, huVK1-39 используются взаимозаменяемо по всему тексту заявки. Очевидно, что специалисты в данной области техники поймут, что «общий» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не идентична.

10 Существует много вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, добавления), которые не оказывают существенного влияния на образование функциональных связывающих областей. Легкая цепь согласно настоящему изобретению также может представлять собой легкую цепь, как указано в настоящем документе выше, имеющую 1-5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их

15 комбинацию.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела, в которых VH способна специфично распознавать первый антиген, и VL, спаренная с VH в вариабельном домене иммуноглобулина, способна специфично распознавать второй антиген. Полученная в результате пара VH/VL будет связывать как антиген 1, так и

20 антиген 2. Такие так называемые «антитела два в одном», описанные, например, в WO 2008/027236, WO 2010/108127 и Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472-486, October 2011), отличаются от биспецифических антител согласно настоящему изобретению и далее называются антителами «два в одном».

В настоящем документе термин «ErbB-2» относится к белку, который у человека

25 кодируется геном ERBB-2. Альтернативные названия 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 человека 2). Если в настоящем документе делается ссылка на ErbB-2, ссылка относится к человеческому ErbB-2. Антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, связывает

30 человеческий ErbB-2. Антигенсвязывающий сайт для ErbB-2 также может, из-за сходства последовательности и третичной структуры между ортологами человека и других млекопитающих, связывать такой ортолог, но необязательно. Номера доступа в базе данных для человеческого белка ErbB-2 и кодирующего его гена следующие (NP_001005862.1, NP_004439.2, NC_000017.10, NT_010783.15, NC_018928.2). Номера

35 доступа в основном приведены, чтобы обеспечить дополнительный способ

идентификации ErbB-2 в качестве мишени, фактическая последовательность белка ErbB-2, связавшая антитело, может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как те, которые встречаются при некоторых видах рака или тому подобном. Антигенсвязывающий сайт для ErbB-2 связывает ErbB-2 и множество его вариантов, таких как те, которые экспрессируются некоторыми ErbB-2-положительными опухолевыми клетками.

В настоящем документе термин «ErbB-3» относится к белку, который у человека кодируется геном ERBB-3. Альтернативные названия гена или белка 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 настоящем документе делается ссылка на ErbB-3, ссылка относится к человеческому ErbB-3. Антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, связывает человеческий ErbB-3. Антигенсвязывающий сайт для ErbB-3 также может, из-за сходства последовательности и третичной структуры между ортологами человека и других млекопитающих, связывать такой ортолог, но необязательно. Номера доступа в базе данных для человеческого белка ErbB-3 и кодирующего его гена следующие (NP_001005915.1, NP_001973.2, NC_000012.11, NC_018923.2, NT_029419.12). Номера доступа в основном приведены, чтобы обеспечить дополнительный способ идентификации ErbB-3 в качестве мишени, фактическая последовательность белка ErbB-3, связанного антителом, может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как те, которые встречаются при некоторых видах рака или тому подобном. Антигенсвязывающий сайт для ErbB-3 связывает ErbB-3 и множество его вариантов, таких как те, которые экспрессируются некоторыми ErbB-2-положительными опухолевыми клетками.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, может снижать или снижает индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке. В присутствии избытка ErbB-2 гетеродимеры ErbB-2/ErbB-3 могут обеспечивать пролиферативный сигнал для экспрессирующей клетки в отсутствие детектируемого лиганда для цепи ErbB-3 в гетеродимере. Эта рецепторная функция ErbB-3 называется в настоящем документе лиганд-независимой рецепторной функцией ErbB-3. Гетеродимер ErbB-2/ErbB-3 также обеспечивает пролиферативный сигнал для экспрессирующей клетки в присутствии лиганда ErbB-3. Эта рецепторная функция ErbB-3 называется в настоящем документе индуцированной лигандом рецепторной функцией ErbB-3.

В настоящем документе термин «лиганд ErbB-3» относится к полипептидам, которые связывают и активируют ErbB-3. Примеры лигандов ErbB-3 включают, но не ограничиваются ими, нейрегулин 1 (NRG) и нейрегулин 2, бетацеллюлин, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста и эпирегулин. Термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты природного полипептида.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения индуцированная лигандом рецепторная функция ErbB-3 представляет собой индуцированное лигандом размножение ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетки. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная клетка представляет собой клетку MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]); клетку SKBR3 (ATCC[®] HTB-30[™]); клетку NCI-87 (ATCC[®] CRL-5822[™]); клетку BxPC-3-luc2 (Perkin Elmer 125058), клетку BT-474 (ATCC[®] HTB-20[™]) или клетку JIMT 1 (DSMZ №: ACC 589).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения ErbB-2 и ErbB-3-положительная клетка содержит по меньшей мере 50000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере 100000 рецепторов ErbB-2. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения ErbB-2 и ErbB-3-положительная клетка содержит по меньшей мере 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения ErbB-2 и ErbB-3-положительная клетка содержит не более 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности. Применяемые в настоящее время терапевтические средства, такие как трастузумаб (герцептин) и пертузумаб, назначаются только пациентам со злокачественными ErbB-2-положительными клетками, которые имеют более 1000000 рецепторов ErbB-2 на своей клеточной поверхности, чтобы получить клинический ответ. Пациентов с ErbB-2-положительными опухолевыми клетками с более чем 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности, как правило, классифицируют как ErbB-2 [+++]. Например, пациентов классифицируют с применением HercepTest[™] и/или HER2 FISH (pharm Dx[™]), оба из которых продаются компанией Dako Denmark A/S, и/или с применением анализа HERmark[®], продаваемого Monogram Biosciences. Трастузумаб и пертузумаб назначают только пациентам с ErbB-2 [+++], поскольку пациенты с более низкими концентрациями ErbB-2, как правило, не проявляют достаточный клинический ответ при лечении с применением трастузумаба и пертузумаба. Однако согласно настоящему изобретению предложены биспецифические антитела, которые также имеют улучшенную аффинность связывания в отношении клеток с более низкой концентрацией рецептора ErbB-2 по сравнению с трастузумабом. Как показано в

примерах, антитело в соответствии с настоящим изобретением эффективно противодействует пролиферации таких клеток с более низкой экспрессией ErbB2. Такая более низкая концентрация рецептора ErbB-2 присутствует на злокачественных клетках пациентов, которые классифицированы как ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+]. Рецидивирующие ErbB-2-положительные опухоли также часто имеют концентрацию рецептора ErbB-2 ниже 1000000 рецепторов на клетку. Таким образом, таких ErbB-2 [++] или ErbB-2 [+] пациентов, а также пациентов с рецидивирующей ErbB-2-положительной опухолью предпочтительно лечат с применением биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением. Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанное антитело может снижать индуцированное лигандом размножение ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетки, которая имеет менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности. Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения субъекта, имеющего ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3-положительную опухоль или подверженного риску развития указанной опухоли, причем указанная опухоль имеет менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности на клетку, при этом указанный способ включает введение субъекту биспецифического антитела или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении субъекта, имеющего ErbB-2, ErbB-3 или ErbB-2/ErbB-3-положительную опухоль или подверженного риску ее развития, причем указанная опухоль имеет менее 1000000 рецепторов ErbB-2 на клеточной поверхности на клетку. Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением, как правило, способно снижать индуцированную лигандом рецепторную функцию, предпочтительно индуцированное лигандом размножение, ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке. Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает домен I ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает домен III ErbB-3. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки, как подробно объясняется в настоящем документе ниже. Аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки 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 антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит антигенсвязывающий сайт, 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 экспонированных на поверхности остатков аминокислот, которые расположены в пределах примерно 5 аминокислотных положений от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426 и экспонированных на поверхности остатков аминокислот, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3.

Чтобы установить, является ли опухоль положительной в отношении ErbB-3, специалист может, например, определить амплификацию гена ErbB-3 и/или его окрашивание с помощью иммуногистохимического метода. По меньшей мере 10% опухолевых клеток при биопсии должны быть положительными. Биопсия также может содержать 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более положительных клеток.

В настоящем документе индуцированная лигандом рецепторная функция 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 индуцированная лигандом рецепторная функция снижается на 80%, более предпочтительно на 90%. Снижение предпочтительно определяют путем определения индуцированной лигандом рецепторной функции в присутствии биспецифического антитела согласно настоящему изобретению и сравнения ее с аналогичной функцией в отсутствие антитела в условиях, идентичных в другом отношении. Условия включают по меньшей мере присутствие лиганда ErbB-3. Количество присутствующего лиганда предпочтительно представляет собой количество, которое индуцирует половину максимального размножения ErbB-2 и ErbB-3-положительной клеточной линии. ErbB-2 и ErbB-3-положительная клеточная линия для этого теста предпочтительно представляет

собой клеточную линию MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]), клеточную линию SKBR3 (ATCC[®] HTB-30[™]), клеточную линию JMT 1 (DSMZ ACC 589) или клеточную линию NCI-87 (ATCC[®] CRL-5822[™]). Тест и/или лиганд для определения индуцированной лигандом рецепторной функции ErbB-3 предпочтительно представляет собой тест на снижение индуцированного лигандом размножения ErbB-3, как указано в примерах.

Белок ErbB-2 содержит несколько доменов (см. для справки фигуру 1 из Landgraf, R Breast Cancer Res. 2007; 9(1): 202-). Внеклеточные домены называются домены I-IV. Место связывания с соответствующими доменами антигенсвязывающих сайтов антител, описанных в настоящем документе, было картировано (см. примеры). Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению с антигенсвязывающим сайтом (первый антигенсвязывающий сайт), который связывает домен I или домен IV ErbB-2 (первый антигенсвязывающий сайт), содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая сохраняет значительную специфичность и аффинность связывания в отношении ErbB-2 в комбинации с различными легкими цепями. Было установлено, что биспецифические антитела с антигенсвязывающим сайтом (первый антигенсвязывающий сайт), который связывает домен I или домен IV ErbB-2 (первый антигенсвязывающий сайт), и с антигенсвязывающим сайтом для ErbB-3 (второй антигенсвязывающий сайт) более эффективно снижают индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 по сравнению с биспецифическим антителом, содержащим антигенсвязывающий сайт (первый антигенсвязывающий сайт), который связывается с другим внеклеточным доменом ErbB-2. Предпочтительным является биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт (первый антигенсвязывающий сайт), который связывает ErbB-2, причем указанный антигенсвязывающий сайт связывается с доменом I или доменом IV ErbB-2. Предпочтительно указанный антигенсвязывающий сайт связывается с доменом IV ErbB-2. Было установлено, что биспецифическое антитело с антигенсвязывающим сайтом (первым антигенсвязывающим сайтом), связывающим ErbB-2, которое дополнительно обладает АЗКЦ, эффективнее других антител, связывающих ErbB-2, которые не обладали значительной активностью АЗКЦ, в частности, в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительным является биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое проявляет АЗКЦ. Было установлено, что антитела, в которых указанный первый антигенсвязывающий сайт связывается с доменом IV ErbB-2, обладают собственной активностью АЗКЦ. ErbB-2-связывающее антитело, связывающее домен I, которое имеет низкую собственную активность АЗКЦ, может быть модифицировано для усиления активности АЗКЦ. Области Fc опосредуют функцию антитела, связываясь с различными рецепторами на иммунных эффекторных клетках, таких как макрофаги,

природные клетки-киллеры, В-клетки и нейтрофилы. Некоторые из этих рецепторов, такие как CD16A (FcγRIIIA) и CD32A (FcγRIIA), активируют клетки, чтобы вызвать ответ против антигенов. Другие рецепторы, такие как CD32B, ингибируют активацию иммунных клеток. Антитела, которые обладают большей способностью опосредовать

5 виды цитотоксической активности, желательные для противораковых моноклональных антител (MAT), могут быть созданы путем модификации областей Fc (за счет введения замен аминокислот), которые связываются с активирующими рецепторами с большей селективностью.

Одной из методик усиления АЗКЦ антитела является афукозилирование. (См.,

10 например, 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). Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое является афукозилированным. Альтернативно или дополнительно, чтобы достичь усиления АЗКЦ

15 можно применять несколько других стратегий, например, гликоинженерию (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) и Eureka Therapeutics) и мутагенез (Xencor и MacroGenics), все из которых направлены на улучшение связывания Fc с низкоаффинными активирующими FcγRIIIa и/или на снижение связывания с низкоаффинными ингибирующими FcγRIIb.

20 Существует несколько способов *in vitro* для определения эффективности антител или эффекторных клеток в отношении вызова АЗКЦ. Они включают анализы высвобождения хрома-51 [Cr⁵¹], анализы высвобождения европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S³⁵]. Обычно меченую клеточную линию-мишень, экспрессирующую определенный экспонированный на поверхности антиген, инкубируют с антителом, специфичным в

25 отношении этого антигена. После промывки эффекторные клетки, экспрессирующие рецептор Fc, CD16, как правило, совместно инкубируют с клетками-мишенями, мечеными антителами. Затем лизис клеток-мишеней, как правило, измеряют по высвобождению внутриклеточной метки, например, с помощью сцинтилляционного счетчика или спектрофотометрии. Предпочтительный тест подробно описан в Примерах.

30 Одним преимуществом настоящего изобретения является то, что связывание антител в соответствии с настоящим изобретением, таких как, например, PB4188, с ErbB-2 и ErbB-3-положительными клетками приводит к интернализации, в той же степени, как и для трастузумаба. Если применяется комбинация трастузумаба и пертузумаба, интернализация этих антител усиливается. Однако усиленная интернализация приводит к

35 снижению АЗКЦ. Таким образом, антитело в соответствии с настоящим изобретением,

приводящее к интернализации в той же степени, как и для трастузумаба, является предпочтительным по сравнению с комбинацией трастузумаба и пертузумаба, поскольку при применении такого антитела активность АЗКЦ поддерживается лучше.

Антитело согласно настоящему изобретению, содержащее антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, препятствует связыванию лиганда ErbB-3 с ErbB-3. Такие антитела более эффективно снижают индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клеточной линии, в частности, применительно к биспецифическому антителу, которое также содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2.

Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения обеспечивают биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт связывает домен I ErbB-2. Как показано в примерах, биспецифические антитела, имеющие эти характеристики, в полной мере способны связывать ErbB-2 и ErbB-3-положительные клетки и противодействовать их активности (такой как индуцированная лигандом рецепторная функция ErbB-3 и индуцированное лигандом размножение ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетки). Более того, биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением, содержащие первый антигенсвязывающий сайт, который связывает домен I ErbB-2, являются особенно подходящими для применения в комбинации с существующими терапевтическими средствами, направленными против ErbB-2, такими как трастузумаб и пертузумаб, поскольку трастузумаб и пертузумаб связывают разные домены ErbB-2. Трастузумаб связывает домен IV ErbB-2, а пертузумаб связывает домен II ErbB-2. Следовательно, предпочтительными являются биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые связывают домен I ErbB-2, поскольку они не конкурируют с трастузумабом и пертузумабом за один и тот же эпитоп.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает домен III ErbB-3. Такое антитело в соответствии с настоящим изобретением является особенно подходящим для комбинированной терапии с используемыми в настоящее время связывающими молекулами, направленными против ErbB-3, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (Merrimack Pharmaceuticals; также называется #Ab6) и RG7116

(Roche), которые связывают домен I ErbB-3, поскольку в этом случае разные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

Предпочтительно предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт связывает домен I ErbB-2 и указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает домен III ErbB-3. Такое антитело является особенно подходящим для комбинированной терапии со связывающими молекулами, направленными против ErbB-2, которые не связываются с доменом I ErbB-2, такими как трастузумаб и пертузумаб, и со связывающими молекулами, направленными против ErbB-3, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (#Ab6) и RG7116.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации предложено биспецифическое антитело, которое содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт связывает домен I ErbB-2 и указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает домен III ErbB-3, и при этом указанное антитело может снижать индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке. Указанное антитело может предпочтительно снижать индуцированное лигандом размножение ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетки.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем аффинность (KD) указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки. В отличие от биспецифических соединений, таких как, например, MM 111 от Merrimack Pharmaceuticals, которые имеют более высокую аффинность в отношении ErbB-2, чем в отношении ErbB-3, согласно настоящему изобретению предложены биспецифические антитела, которые имеют ErbB-3-специфичное плечо с аффинностью в отношении ErbB-3 на клетках, которая выше аффинности ErbB-2-специфичного плеча в отношении ErbB-2 на клетках. Такие биспецифические антитела обладают лучшей способностью связывать ErbB-3, несмотря на низкую концентрацию ErbB-3 на клеточной поверхности. Это обеспечивает преимущество, которое заключается в том, что функциональная активность против ErbB-3 повышается по сравнению с соединениями предшествующего уровня

техники, это означает, что биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением обладают лучшей способностью противодействовать активности ErbB-3 (такой как индуцированное лигандом размножение).

В настоящем документе термин «аффинность» относится к значению KD.

5 Аффинность (KD) указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки 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. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного второго
10 антигенсвязывающего сайта в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 1,39-0,59 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации
15 настоящего изобретения аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении 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 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. Согласно одному варианту реализации
20 настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 0,31-0,15 нМ. Вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивномеченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

25 Аффинность (KD) указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2 на
30 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 3,0-1,6 нМ. Согласно одному
35 предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного

первого антигенсвязывающего сайта в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 4,5-3,3 нМ. Вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивномеченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем аффинность (KD) указанного биспецифического антитела в отношении клеток 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.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 3,7-2,7 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, причем аффинность указанного биспецифического антитела в отношении клеток 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, предпочтительно ниже или равна 2,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 2,0 нМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 2,4-1,6 нМ. Аналогичным образом, вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивномеченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

Согласно дополнительным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем аффинность (KD) указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки, и при этом указанное антитело может снижать индуцированную

лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке. Указанное антитело может предпочтительно снижать индуцированное лигандом размножение ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетки.

Вышеупомянутые антитела в соответствии с настоящим изобретением с высокой аффинностью в отношении ErbB-3 предпочтительно связывают домен I ErbB2 и/или домен III ErbB-3. Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает домен I ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем аффинность (KD) указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки. Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает домен III ErbB-3, причем аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает домен I ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает домен III ErbB-3, причем аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки.

Указанный второй антигенсвязывающий сайт предпочтительно связывает домен III ErbB-3 и имеет аффинность (KD) в отношении ErbB-3-положительной клетки, 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. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает домен III ErbB-3 и обладает аффинностью в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 1,39-0,59 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

указанный второй антигенсвязывающий сайт связывает домен III ErbB-3 и имеет аффинность в отношении 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 ниже или равна 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 0,31-0,15 нМ.

Указанный первый антигенсвязывающий сайт предпочтительно связывает домен I ErbB-2 и обладает аффинностью (KD) в отношении ErbB-2-положительной клетки, которая ниже или равна 5,0 нМ, более предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный первый антигенсвязывающий сайт связывает домен I ErbB-2 и имеет аффинность в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 3,0-1,6 нМ. Аффинность указанного биспецифического антитела в отношении клеток 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 2,4-1,6 нМ.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный первый антигенсвязывающий сайт связывает домен I ErbB-2 и обладает аффинностью (KD) в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 4,5-3,3 нМ. Аффинность указанного биспецифического антитела в отношении клеток 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 3,7-2,7 нМ.

Аналогичным образом, вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивно меченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанное антитело может снижать индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке, при этом указанное биспецифическое антитело не оказывает значительного влияния на выживание кардиомиоцитов. Кардиотоксичность является известным фактором риска при видах терапии, нацеленных на ErbB-2, и частота осложнений увеличивается при применении трастузумаба в комбинации с антрациклинами, что вызывает сердечный стресс. Например, комбинация доксициклина (DOX) с трастузумабом вызывает тяжелые побочные эффекты со стороны сердца. В клинических исследованиях определили, что у 5%-10% пациентов, которые получают трастузумаб в адъювантной схеме для лечения рака молочной железы, развивается сердечная дисфункция (Guarneri et al., J Clin Oncol., 1985, 3:818-26; Ewer MS et al., Nat Rev Cardiol 2010;7:564-75). Однако в ретроспективном исследовании было продемонстрировано, что риск развития бессимптомной сердечной дисфункции фактически достигает 25% при применении трастузумаба в адъювантной схеме с DOX (Wadhwa et al., Breast Cancer Res Treat 2009;117:357-64). Как показано в примерах, согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые нацелены на ErbB-2 и которые не влияют или влияют в значительно сниженной степени на выживание кардиомиоцитов по сравнению с трастузумабом и пертузумабом. Это обеспечивает важное преимущество, поскольку кардиотоксичность снижается. Это еще предпочтительно для людей, которые не страдают нарушением сердечной функции, и даже в большей мере для людей, которые действительно страдают нарушением сердечной функции, или тех, кто подвергается риску ее развития, таких как, например, субъекты, страдающие застойной сердечной недостаточностью (ЗСН), дисфункцией левого желудочка (LVD) и/или $\geq 10\%$ снижением фракции выброса левого желудочка (LVEF), и/или субъекты, перенесшие инфаркт миокарда. Таким образом, предпочтительными являются антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые не оказывают

значительного влияния на выживание кардиомиоцитов. Функцию кардиомиоцитов в условиях *in vitro*, например, измеряют путем определения жизнеспособности кардиомиоцитов, путем определения BNP (натрийуретический пептид В-типа, который является биомаркером сердца), путем определения удлинения интервала QT и/или путем

5 определения потенциала митохондриальной мембраны.

 Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает домен I ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает домен III ErbB-3. Согласно одному варианту реализации предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением,

10 которое не оказывает значительного влияния на выживание кардиомиоцитов, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки равна или выше аффинности указанного первого антигенсвязывающего сайта в отношении

15 ErbB-2-положительной клетки. Аффинность указанного второго антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки 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 антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки предпочтительно ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно

20 ниже или равна 4,5 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,0 нМ.

 Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело, которое не оказывает значительного влияния на выживание кардиомиоцитов, содержит:

 - по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере

25 последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность вариабельной области тяжелой цепи, ErbB-2-специфичной 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 10А или Фигуре 10Е, или

30 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 указанных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи; и/или

 - по меньшей мере последовательность CDR3, предпочтительно по меньшей мере

35 последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, или по меньшей мере последовательность

вариабельной области тяжелой цепи, ErbB-3-специфичной 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 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, 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 указанных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело представляет собой PB4188.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере один остаток аминокислоты домена I ErbB-2, выбранный из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181 и экспонированных на поверхности остатков аминокислот, которые расположены в пределах примерно 5 аминокислотных положений от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181. Нумерация остатков аминокислот соответствует нумерации Банка данных белков (PDB) ID #1S78. Как показано в Примерах, антитела, связывающие эту область домена I ErbB-2, проявляют особенно хорошие характеристики связывания и способны противодействовать активности ErbB-2-положительных клеток (такой как индуцированная лигандом рецепторная функция ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке и/или индуцированное лигандом размножение такой клетки). Кроме того, такие антитела являются особенно подходящими для комбинированной терапии с известными в настоящее время моноклональными антителами, направленными против ErbB-2, такими как трастузумаб (который связывает домен IV ErbB-2) и пертузумаб (который связывает домен II ErbB-2), поскольку они связывают различные домены ErbB-2. Следовательно, эти антитела можно применять одновременно без конкуренции за один и тот же эпитоп. Термин «экспонированные на поверхности остатки аминокислот, которые расположены в пределах примерно 5 аминокислотных положений от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181» относится к остаткам аминокислот, которые находятся в первичной аминокислотной последовательности, расположенной в пределах примерно первых пяти остатков аминокислот, примыкающих к указанным остаткам, и которые по меньшей мере

частично экспонированы на внешней стороне белка так, что они могут быть связаны антителами (см., например, Фигуру 21В в WO2015/130173). Предпочтительно указанный остаток аминокислоты, расположенный примерно в 5 аминокислотных положениях от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181, выбран из группы, состоящей из L139, C140, Y141, Q142, D143, I145, L146, W147, K148, 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 антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 остатка аминокислот домена I ErbB-2, выбранных из группы, состоящей из T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181 и экспонированных на поверхности остатков аминокислот, которые расположены в пределах 5 аминокислотных положений от T144, T164, R166, P172, G179, S180 или R181.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере T144, R166 и R181 домена I ErbB-2. Согласно другому варианту реализации предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере T144, R166, P172, G179 и R181 домена I ErbB-2. Согласно другому варианту реализации предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере T144, T164, R166, P172, G179, S180 и R181 домена I ErbB-2.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере одну аминокислоту домена III ErbB-3, выбранную из группы, состоящей из R426 и экспонированных на поверхности остатков аминокислот, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3. Нумерация остатков аминокислот соответствует нумерации Банка данных белков (PDB) ID #4P59. Как показано в примерах, антитела, связывающие эту область домена III ErbB-3, проявляют особенно хорошие характеристики связывания и способны противодействовать активности ErbB-3-положительных клеток (такой как индуцированная лигандом рецепторная функция ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке и/или индуцированное лигандом размножение такой клетки). Термин «экспонированные на поверхности остатки аминокислот, которые

расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном белке ErbB-3» относится к остаткам аминокислот, которые находятся в третичной структуре белка ErbB-3, пространственно расположенным в пределах 11,2 Å от R426, и которые по меньшей мере частично экспонированы на внешней стороне белка так, что они могут быть связаны антителами.

5 Предпочтительно указанные остатки аминокислот, 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 WO2015/130173). Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело в соответствии с
10 настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере R426 домена III ErbB-3. Предпочтительно указанное антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который связывает по меньшей мере R426 домена III ErbB-3.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно
15 афукозилировано для усиления активности АЗКЦ. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит сниженное количество фукозилирования N-связанной углеводной структуры в области Fc по сравнению с тем же антителом, вырабатываемым в нормальной клетке СНО.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно
20 применяется у человека. С этой целью биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

Толерантность человека к полипептиду определяется многими различными аспектами. Иммуниет, будь то опосредуемый Т-клетками, опосредуемый В-клетками или
25 другой, является одной из переменных, которые включены в толерантность человека к полипептиду. Константная область биспецифического антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой человеческую константную область. Константная область может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных различий с константной областью
30 природного человеческого антитела. Предпочтительно константная часть полностью происходит из природного человеческого антитела. Различные антитела, полученные согласно настоящему документу, происходят из библиотеки переменных доменов человеческих антител. Как таковые эти переменные домены являются человеческими. Уникальные области CDR могут происходить от человека, могут быть синтетическими
35 или могут происходить из другого организма. Переменная область считается

человеческой вариабельной областью, если она имеет аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности вариабельной области природного человеческого антитела, за исключением области CDR. Вариабельная область ErbB-2-связывающей VH, ErbB-3-связывающей VH или легкой цепи в антителе согласно настоящему изобретению может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных различий с вариабельной областью природного человеческого антитела, не считая возможных различий в аминокислотной последовательности областей CDR. Такие мутации встречаются также в природе в случае соматической гипермутации.

Антитела могут происходить из различных видов животных, по меньшей мере в отношении вариабельной области тяжелой цепи. Гуманизация является обычной практикой, например, вариабельных областей тяжелой цепи мыши. Это может быть достигнуто различными способами, включая CDR-трансплантацию в вариабельную область человеческой тяжелой цепи с трехмерной структурой, которая соответствует трехмерной структуре вариабельной области тяжелой цепи мыши; деиммунизацию вариабельной области тяжелой цепи мыши, которую предпочтительно проводят путем удаления известных или предполагаемых эпитопов Т- или В-клеток из вариабельной области тяжелой цепи мыши. Удаление, как правило, происходит путем замены одной или более аминокислот в эпитопе другой (обычно консервативной) аминокислотой так, что последовательность эпитопа модифицируется таким образом, что он больше не является эпитопом Т- или В-клеток.

Такие деиммунизированные вариабельные области тяжелой цепи мыши являются менее иммуногенными для человека, чем исходные вариабельные области тяжелой цепи мыши. Предпочтительно вариабельная область или домен согласно настоящему изобретению дополнительно гуманизированы, например, путем рекомбинации поверхностных остатков. При применении методик рекомбинации поверхностных остатков внешние остатки, которые легко вступают в контакт с иммунной системой, селективно заменяются человеческими остатками, чтобы обеспечить гибридную молекулу, которая содержит либо слабоиммуногенную, либо по существу неиммуногенную поверхность с рекомбинированными остатками. Животное, применяемое согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно примата, наиболее предпочтительно человека.

Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит константную область человеческого антитела. Антитела сгруппированы в пять классов или изотипов в соответствии с различиями в их

константных доменах тяжелой цепи: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Эти классы или изотипы содержат по меньшей мере одну из указанных тяжелых цепей, которая названа соответствующей греческой буквой. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанная константная область выбрана из группы константных областей IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, более предпочтительно указанная константная область содержит константную область IgG, более предпочтительно константную область IgG1, предпочтительно мутированную константную область IgG1. Некоторая изменчивость константной области IgG1 происходит в природе, например, такая как аллотипы G1m1, 17 и G1m3, и/или допускается без изменения иммунологических свойств полученного антитела. Как правило, в константной области допускается от 1 до 10 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинация.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее переменный домен, который связывает ErbB-2, причем указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3 ErbB-2-специфичной 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 10А или Фигуре 10Е, или причем 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 10А или Фигуре 10Е. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 MF3958.

Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-2-специфичной 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 10А или Фигуре 10Е, 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 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 MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3958.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее переменный домен, который связывает ErbB-3, причем указанное антитело содержит по меньшей мере последовательность CDR3 ErbB-3-специфичной 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 10B или Фигуре 10E, или Фигуре 11, или причем 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 10B или Фигуре 10E, или Фигуре 11. Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178.

Указанное антитело предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-3-специфичной 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 10B или Фигуре 10E, или Фигуре 11, 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 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 MF3178, MF3176,

MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3178.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 ErbB-2-специфичной 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 10А или Фигуре 10Е, 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 10А или Фигуре 10Е, и причем указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 ErbB-3-специфичной 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 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, 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 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 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11. Указанный первый антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 MF3958 и указанный второй антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178.

Указанный первый антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-2-специфичной 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 10А или Фигуре 10Е, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR 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 MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898, и указанный второй антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-3-специфичной 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 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, 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 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, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11. Указанный первый антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 или MF3991, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3958, и указанный второй антигенсвязывающий сайт предпочтительно содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, наиболее предпочтительно по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3178.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3958 или последовательность CDR3, которая отличается не

более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 MF3958, и причем указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178 или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 MF3178.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 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 MF3958, и причем указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 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 MF3178.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3958 и причем указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR3 MF3178.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-2, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает ErbB-3, причем указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3958, и причем указанный второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 MF3178.

Последовательности CDR, например, варьируются в целях оптимизации, предпочтительно для улучшения эффективности связывания или стабильности антитела. Оптимизацию, например, выполняют с помощью процедур мутагенеза, предпочтительно с последующим испытанием стабильности и/или аффинности связывания полученных

антител и предпочтительно отбирают улучшенную ErbB-2 или ErbB-3-специфичную последовательность CDR. Специалист в данной области техники способен получить варианты антител, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR в соответствии с настоящим изобретением. Например, применяют консервативную замену аминокислоты. Примеры консервативных замен аминокислот включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, другим гидрофобным остатком и замену одного полярного остатка другим полярным остатком, например, замену аргинина лизином, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой или глутамина аспарагином.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает ErbB-2, причем цепь VH указанного вариабельного домена содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (гуманизированный MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (гуманизированный MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенных на Фигуре 10А или Фигуре 10Е; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (гуманизированный MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (гуманизированный MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенных на Фигуре 10А или Фигуре 10Е, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно вышеупомянутой последовательности цепи VH согласно Фигуре 10А или Фигуре 10Е. Цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-2, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность:

- MF1849; или
- MF2971 или ее гуманизированный вариант, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3958; или
- MF3004 или ее гуманизированный вариант, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3991;

как изображено на Фигуре 10А. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения цепь VH вариабельного домена, который связывает ErbB-2, содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF1849; или MF2971 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3958; или MF3004 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант

предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3991, причем указанные последовательности VH имеют не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно соответствующей последовательности, изображенной на Фигуре 10А. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-2, содержит аминокислотную последовательность MF3958; или содержит аминокислотную последовательность MF3958, изображенную на Фигуре 10А, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно последовательности цепи VH. Антитело, содержащее переменный домен, который связывает ErbB-2, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, которое предпочтительно дополнительно содержит переменный домен, который связывает ErbB-3. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность 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, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11; или содержит аминокислотную последовательность 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, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно последовательности цепи VH согласно Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или содержит аминокислотную последовательность MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно соответствующей последовательности цепи VH согласно Фигуре 10В или Фигуре 11. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, содержит аминокислотную последовательность

MF3178; или содержит аминокислотную последовательность MF3178, изображенную на Фигуре 10В, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно последовательности цепи VH. Предпочтительно вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены не присутствуют в области CDR3. Вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно не присутствуют в областях CDR1 и CDR2. Вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно не присутствуют в области FR4.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее переменный домен, который связывает ErbB-3, причем цепь VH указанной переменной области содержит аминокислотную последовательность 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, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, или содержит аминокислотную последовательность 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, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно указанной последовательности цепи VH. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB3, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно указанной последовательности цепи VH. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-3, содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, изображенную на Фигуре 10В; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, изображенную на Фигуре 10В, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно

последовательности цепи VH. Антитело, 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 содержит аминокислотную последовательность цепи VH согласно Фигуре 10А или Фигуре 10Е. Цепь VH переменного домена, который связывает ErbB-2, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF1849; или MF2971 или ее гуманизованного варианта, причем указанный гуманизованный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3958; или MF3004 или ее гуманизованного варианта, причем указанный гуманизованный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3991, изображенных на Фигуре 10А. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанные ErbB-2-связывающие последовательности VH имеют не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно соответствующей последовательности, изображенной на Фигуре 10А. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная ErbB-2-связывающая цепь VH согласно Фигуре 10А содержит аминокислотную последовательность MF3958; или содержит аминокислотную последовательность MF3958, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно последовательности цепи VH. Предпочтительно вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены не присутствуют в области CDR3. Вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно не присутствуют в областях CDR1 и CDR2. Вышеупомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно не присутствуют в области FR4.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит ErbB-2-специфичную последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей переменной области тяжелой цепи MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на Фигуре 10А или Фигуре 10Е, или причем указанное антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 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.

5 Согласно настоящему изобретению также предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело содержит ErbB-3-специфичную 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; 10 MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 и MF6074, изображенных на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, или причем указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 15 4 или 5 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.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено 20 антитело, содержащее два антигенсвязывающих сайта, которые связывают ErbB-2, причем по меньшей мере один из указанных антигенсвязывающих сайтов связывает домен I ErbB-2. Предпочтительно оба антигенсвязывающих сайта связывают домен I ErbB-2. Такое антитело в соответствии с настоящим изобретением является особенно подходящим для комбинированной терапии с применяемыми в настоящее время связывающими 25 молекулами, направленными против ErbB-2, которые не связывают домен I ErbB-2, такими как трастузумаб, который связывает домен IV ErbB-2, и пертузумаб, который связывает домен II ErbB-2, поскольку в этом случае разные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее два 30 антигенсвязывающих сайта, которые связывают ErbB-2, причем по меньшей мере один из указанных антигенсвязывающих сайтов связывает домен I ErbB-2 и при этом аффинность (KD) указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-2-положительной клетки ниже или равна 5,0 нМ, предпочтительно ниже или равна 4,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 3,9 нМ. Предпочтительно оба 35 антигенсвязывающих сайта связывают домен I ErbB-2. Согласно одному

предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 3,0-1,6 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении 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. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 4,5-3,3 нМ.

Вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивно меченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее два переменных домена, которые связывают ErbB-2, причем цепь VH указанных переменных доменов содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (гуманизированный MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (гуманизированный MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 или MF1898, изображенных на Фигуре 10А или Фигуре 10Е; или аминокислотную последовательность цепи VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (гуманизированный MF2971); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (гуманизированный MF3004); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; цепей VH MF3001, MF3003 или MF1898, изображенных на Фигуре 10А или Фигуре 10Е, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно соответствующей последовательности, изображенной на Фигуре 10А или Фигуре 10Е. Указанная VH предпочтительно содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF1849; или MF2971 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3958; или MF3004 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную

последовательность MF3991, изображенных на Фигуре 10А; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF1849; или MF2971 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3958; или MF3004
5 или ее гуманизированного варианта, причем указанный гуманизированный вариант предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF3991, изображенных на Фигуре 10А, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно соответствующей последовательности,
10 изображенной на Фигуре 10А. Вариабельные домены антитела предпочтительно содержат идентичные цепи VH, предпочтительно имеющие последовательность, изображенную на Фигуре 10А или Фигуре 10Е. Антитело с вариабельными доменами с идентичными цепями VH не является биспецифическим антителом. Цепи VH идентичны в соответствии с настоящим изобретением, если они содержат ту же последовательность цепи VH, как и
15 изображенная на Фигуре 10А или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, или ту же последовательность цепи VH, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинации относительно соответствующей последовательности, изображенной на Фигуре 10А или Фигуре 10Е, или Фигуре 11.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено
20 антитело, содержащее два антигенсвязывающих сайта, которые связывают ErbB-3, причем по меньшей мере один из указанных антигенсвязывающих сайтов связывает домен III ErbB-3. Предпочтительно оба антигенсвязывающих сайта связывают домен III ErbB-3. Такое антитело в соответствии с настоящим изобретением является особенно подходящим для комбинированной терапии с применяемыми в настоящее время связывающими
25 молекулами, направленными против ErbB-3, которые не связывают домен III ErbB-3, такими как MM-121 (#Ab6) и RG7116, которые связывают домен I ErbB-3, поскольку в этом случае разные связывающие молекулы не конкурируют друг с другом за один и тот же эпитоп.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее два
30 антигенсвязывающих сайта, которые связывают ErbB-3, причем по меньшей мере один из указанных антигенсвязывающих сайтов связывает домен III ErbB-3 и при этом аффинность (KD) указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении ErbB-3-положительной клетки ниже или равна 2,0 нМ, предпочтительно ниже
или равна 1,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 1,39 нМ, более
35 предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Предпочтительно оба антигенсвязывающих

сайта связывают домен III ErbB-3. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении 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 1,39 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,99 нМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 1,39-0,59 нМ. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения аффинность указанного по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта в отношении 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 или равна 0,5 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,31 нМ, более предпочтительно ниже или равна 0,23 нМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанная аффинность находится в пределах диапазона 0,31-0,15 нМ.

Аналогичным образом, вышеупомянутые значения аффинности предпочтительно измеряют с применением измерений аффинности клеток в стационарном состоянии, причем указанные клетки инкубируют при 4°C с применением радиоактивно меченого антитела, затем связанную с клеткой радиоактивность измеряют, как описано в Примерах.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее два переменных домена, каждый из которых связывает ErbB3, причем VH переменных доменов содержит аминокислотную последовательность 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, изображенных на Фигуре 10B или Фигуре 10E, или Фигуре 11; или содержит аминокислотную последовательность 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, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно любой из указанных последовательностей цепи VH. Указанная VH предпочтительно содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 или MF6065, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3,

4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно любой из указанных последовательностей цепи VH. Указанная VH предпочтительно содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178; или содержит аминокислотную последовательность цепи VH MF3178, изображенную на Фигуре 10В, имеющую не более чем 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, более предпочтительно не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию относительно последовательности цепи VH MF3178. Вариабельные домены антитела предпочтительно содержат идентичные цепи VH, предпочтительно имеющие последовательность, изображенную на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11. Антитело с 10 вариабельными доменами с идентичными цепями VH не является биспецифическим антителом. Цепи VH являются идентичными, если они содержат ту же последовательность цепи VH, как и изображенная на Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11, или ту же последовательность цепи VH, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинации относительно 15 последовательности цепи VH согласно Фигуре 10В или Фигуре 10Е, или Фигуре 11.

ErbB-2/ErbB-3-специфичное антитело, раскрытое в настоящем документе, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. Антитело предпочтительно содержит вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-2- 20 специфичной вариабельной области тяжелой цепи MF3958, изображенной на Фигуре 10, или последовательности CDR, которые отличаются не более чем 3 аминокислотами, предпочтительно не более чем 2 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1 аминокислотой от последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3958, и вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере 25 последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-3-специфичной вариабельной области тяжелой цепи MF3178, изображенной на Фигуре 10, или 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 MF3178.

ErbB-2/ErbB-3-специфичное антитело предпочтительно содержит ErbB-2- 30 специфичный вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи MF3958, изображенную на Фигуре 10, с 0-10, предпочтительно 0-5, предпочтительно 0, 1 или 2 аминокислотными заменами, и ErbB-3-специфичный вариабельный домен с вариабельной 35 областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность вариабельной

области тяжелой цепи MF3178, изображенную на Фигуре 10, с 0-10, предпочтительно 0-5, предпочтительно 0, 1 или 2 аминокислотными заменами. Легкая цепь в этих антителах предпочтительно представляет собой легкую цепь согласно Фигуре 10C.

Способ лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития рака молочной железы, предпочтительно дополнительно включает определение уровня экспрессии рецептора эстрогена, ErbB-2, ErbB-3, или их комбинации на клетках указанного рака.

Субъект, страдающий от рака молочной железы или подверженный риску развития рака молочной железы, предпочтительно представляет собой человека. Об индивидууме говорят как о подверженном риску развития рака молочной железы, если этот индивидуум в прошлом имел рак молочной железы, но находится в стадии его ремиссии так, что рак не может быть обнаружен при обычных осмотрах. Такой индивидуум может считаться излеченным, но этот индивидуум имеет более высокий риск развития рака молочной железы по сравнению с нормальным здоровым индивидуумом того же возраста. Рак молочной железы может представлять собой рецидивирующий рак в местоположении первичного рака, который был в стадии ремиссии, или метастаз рака молочной железы, как правило, в местоположении, отличном от местоположения первичного рака.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения субъекта, который имеет рак молочной железы или который подвергается риску развития указанного рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела, которое может связывать внеклеточную часть ErbB-2 и которое ингибирует димеризацию ErbB-2/ErbB-3 на раковой клетке, причем указанный рак представляет собой рак, положительный по рецептору гормона. Антитело предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, которое имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3. Антитело предпочтительно представляет собой биспецифическое ErbB-2/ErbB-3-специфичное антитело, раскрытое в настоящем документе. Способ предпочтительно дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии субъекту, нуждающемуся в этом. Рак предпочтительно представляет собой иммуногистохимический ErbB-2+ рак или иммуногистохимический ErbB-2++ рак без амплификации гена ErbB-2.

Как правило, биспецифическое антитело и эндокринную терапию будут вводить повторно в течение курса лечения. Например, в определенных вариантах реализации субъекту, нуждающемуся в лечении, вводят многократные (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10 или более) дозы эндокринной терапии и многократные (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) дозы биспецифического антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения введения
эндокринной терапии можно осуществлять ежедневно, несколько дней в неделю,
5 еженедельно, раз в две недели, каждые 3 или 4 недели или с более длительными
интервалами, и биспецифическое антитело можно вводить еженедельно, раз в две недели,
каждые 3 или 4 недели или с более длительными интервалами. Биспецифическое антитело
и эндокринную терапию можно вводить, но не обязательно, в соответствии с одной и той
же схемой введения. Таким образом, эндокринную терапию и биспецифическое антитело
10 можно вводить в один и тот же день или в разные дни, в разных последовательностях
(сначала эндокринная терапия и затем биспецифическое антитело или наоборот).
Эндокринная терапия может быть введена за 1 или более дней до или после
биспецифического антитела или наоборот.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доза
15 биспецифического антитела и/или эндокринной терапии варьируется в зависимости от
времени. Доза эндокринной терапии и/или биспецифического антитела может быть
одинаковой на протяжении всего лечения. Согласно другому варианту доза эндокринной
терапии и/или биспецифического антитела может быть выше в начале, например, более
высокая нагрузочная доза (которая может представлять собой единственную дозу или
20 несколько доз), после которой следует поддерживающая доза. Согласно другому варианту
доза эндокринной терапии и/или биспецифического антитела может быть ниже в начале
(может представлять собой единственную дозу или несколько доз), после которой следует
поддерживающая доза. Кроме того, или в качестве альтернативы, начальная схема
введения эндокринной терапии или агентов, или обоих, которая была начата как
25 еженедельная схема, может измениться на схему введения раз в две недели или другую.
Клиницист может использовать предпочтительные дозировки и/или схемы дозирования,
которые оправданы при состоянии пациента, которого лечат.

Лечение с применением эндокринной терапии может быть начато с меньших
дозировок, которые ниже оптимальной дозы соединения. После этого дозировка может
30 быть увеличена на небольшие количества, пока не будет достигнут оптимальный эффект
при данных обстоятельствах. Для удобства общую суточную дозировку можно разделить
и вводить частями в течение дня, при необходимости. Также можно применять
прерывистую терапию (например, одна неделя из трех недель или три из четырех недель).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
35 биспецифическое антитело вводят в фиксированной дозе примерно 750 мг каждые 3

недели, но в качестве альтернативы его можно вводить в фиксированной дозе в диапазоне от 300 мг до 900 мг в соответствии со схемой введения еженедельно, каждые две недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или с более длительными интервалами.

Если в настоящем документе диапазоны приведены от числа 1 до числа 2, то диапазон включает число 1 и число 2. Например, диапазон от 2 до 5 включает числа от 2 до 5.

Если в настоящем документе делается ссылка на аффинность, которая выше, чем другая, K_d = ниже другого K_d . Во избежание сомнений K_d 10^{-9} М ниже, чем K_d 10^{-8} М. Аффинность антитела с K_d 10^{-9} М в отношении мишени выше, чем в случае если K_d составляет 10^{-8} М.

Для ясности и краткости описания признаки описаны в настоящем документе как часть одинаковых или отдельных вариантов реализации, однако следует понимать, что объем настоящего изобретения может включать варианты реализации, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Средние и индивидуальные изменения роста опухоли в ксенотрансплантате опухоли молочной железы человека HBCx-34. Обработки начинали через 36 дней после имплантации HBCx-34. Носитель MCLA-128 и MCLA-128 в дозе 25 мг/кг вводили на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 и носитель летрозол и летрозол в дозе 2,5 мг/кг вводили ежедневно в течение 57 дней. Начальный размер группы: 9-10 животных.

Фигура 2. T/C% в ксенотрансплантате опухоли молочной железы человека HBCx-34. Обработки начинали через 36 дней после имплантации HBCx-34. Носитель MCLA-128 и MCLA-128 в дозе 25 мг/кг вводили на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 и носитель летрозол и летрозол в дозе 2,5 мг/кг вводили ежедневно в течение 57 дней. Начальный размер группы: 9-10 животных.

Фигура 3. Средние и индивидуальные относительные изменения массы тела в ксенотрансплантате опухоли молочной железы человека HBCx-34. Обработки начинали через 36 дней после имплантации HBCx-34. Носитель MCLA-128, MCLA-128 в дозе 25 мг/кг вводили на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 и носитель летрозол и летрозол в дозе 2,5 мг/кг вводили ежедневно в течение 57 дней. Начальный размер группы: 9-10 животных.

Фигура 4. Характеристики роста в условиях *in vivo* модели HBCx-34 PDX. А, ИГХ характеристики опухолей HBCx-34 PDX. В, Бестимусным голым мышам подкожно прививали опухоли HBCx-34. Животные, получавшие эстрогены, получили либо

носитель, либо фулвестрант, и животные, которые не получали эстрогены, получали носитель или летрозол. Добавление эстрогена индуцировало более быстрый рост опухоли, а летрозол значительно уменьшал образование эстроген-независимых опухолей. Т-тесты выполняли для сравнения объемов опухолей из эстроген-независимых опухолей, обработанных носителем или летрозолом (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$).

Фигура 5. Объемы опухолей у мышей с ксенотрансплантатами MCF-7 на 25 день. Обработки начинали

Носитель MCLA-128, MCLA-128 в дозе 25 мг/кг вводили на D0, D1, D4, D8, D11, D15 D22 и D25 и носитель для гормональной терапии и тамоксифен вводили через день (D1, D3, D5 и т. д.). Фулвестрант вводили один раз в неделю. Статистическая значимость для критерия Краскела-Уоллиса, критерия Данна или U-критерия Манна-Уитни для сравнения с группой носителя: ns означает недостоверно, * означает $0,01 < P < 0,05$, ** означает $0,001 < P < 0,01$, *** означает $P < 0,001$. TGI > 60% указывает на потенциальную терапевтическую активность. MTV: средний объем опухоли, G1 MTV: MTV группы 1 (носитель), TGI: ингибирование роста опухоли.

Фигура 6. Объемы опухолей у мышей с ксенотрансплантатами MCF-7, получавших MCLA-128, фулвестрант или тамоксифен в виде монотерапии или комбинированной терапии. Для каждой временной точки с помощью статистического t-теста сравнивали фулвестрант с фулвестрантом + MCLA-128 и тамоксифен с тамоксифеном + MCLA-128. Ns означает недостоверно, * означает $P < 0,05$; ** означает $P < 0,01$.

Фигура 7. Корреляция между анализами для двух независимых анализов VegaTag. Оценки анализов, полученные в анализах раунда 1 и раунда 2, наносили на график XY и сравнивали с применением линейной регрессии $x=y$. Все анализы показали хорошую корреляцию между результатами двух временных точек, при этом только образец «Gr.7 Ап.3» показал изменение коэффициента вариации более 20% (KB%).

Фигура 8. Модуляция уровней общего HER2, общего HER3 и димеров HER2:HER3 в опухолях MCF-7 после 8-дневного периода лечения. Мышей с ксенотрансплантатами лечили в течение 8 дней с применением в общей сложности 3 доз MCLA-128 или 2 доз фулвестранта или их комбинации. Через 24 часа после введения последней дозы опухоли собирали, обрабатывали для фиксации формалином и заливки парафином (FFPE) и подвергали анализу VegaTag для указанных анализов. Для окончательного анализа использовали пять независимых опухолей на группу лечения. Статистический t-критерий использовали для независимого сравнения всех групп. ** означает $P < 0,01$.

Фигура 9. Массив белков с обращенной фазой (RPPA) в ксенотрансплантатах опухолей MCF-7, обработанных носителем, MCLA-128, фулвестрантом, тамоксифеном,

MCLA-128 + фулвестрант или MCLA-128 + тамоксифен. Белки, детектированные в этом анализе, включали (фосфо)-Akt и (фосфо)-HER3 (полные данные представлены в Приложении 4). Односторонний дисперсионный анализ использовали для сравнения уровней во всех опухолях, полученных из групп лечения, с уровнями, полученными в группе фосфатно-солевого буфера (ФСБ). ** обозначает $P < 0,01$.

Фигура 10. Нуклеиновые и аминокислотные последовательности цепей VH, общей легкой цепи и тяжелых цепей антител согласно настоящему изобретению. В том случае, если на этой Фигуре указана лидерная последовательность, она не является частью цепи VH или антитела, но, как правило, отщепляется во время процессинга белка в клетке, которая вырабатывает белок.

Фигура 11. Выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей вариантов MF3178. Области CDR указаны.

Фигура 12. Дизайн исследования для комбинированной терапии: MCLA-128 + эндокринная терапия.

Фигура 13. Назначение лечения для исследования комбинированной терапии: MCLA-128 + эндокринное лечение - все циклы.

ПРИМЕРЫ

В настоящем документе «MFXXXX», где X независимо представляет собой численную величину 0-9, относится к Fab, содержащему переменный домен, в котором VH имеет аминокислотную последовательность, обозначенную 4 цифрами. Если не указано иное, переменная область легкой цепи переменного домена, как правило, имеет последовательность переменной области легкой цепи согласно Фигуре 10C. Легкая цепь, как правило, представляет собой легкую цепь, указанную на Фигуре 10C. «MFXXXX VH» относится к аминокислотной последовательности VH, обозначенной 4 цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи, которая обычно взаимодействует с константной областью легкой цепи. PG относится к моноспецифическому антителу, содержащему идентичные тяжелые и легкие цепи. PB относится к биспецифическому антителу с двумя разными тяжелыми цепями. Переменные области VH тяжелых цепей отличаются и, как правило, также отличаются области CH3, причем одна из тяжелых цепей имеет мутацию KK своего домена CH3, а другая имеет комплементарную мутацию DE своего домена CH3 (см. ссылку PCT/NL2013/050294 (опубликовано как WO2013/157954)).

Пример 1

Противоопухолевую эффективность антитела, нацеленного на HER2/HER3, определяли применительно к комбинированному лечению вместе с ингибитором

ароматазы. MCLA-128 применяли в качестве предпочтительного примера биспецифического антитела, нацеленного на Her2/Her3. Его применяли как отдельный агент и в комбинации с ингибитором ароматазы летрозолом. В качестве примера рака молочной железы применяли ксенотрансплантатную модель гормонозависимого рака молочной железы, полученного от пациента, HBCx-34, созданную у мышей с иммунодефицитом.

Ксенотрансплантатные модели опухолей человека

Образцы опухолей человека различного гистологического происхождения получали при наличии информированного согласия пациентов, которых лечили в онкологических центрах, и приживляли как трансплантируемые ксенотрансплантаты у мышей с иммунодефицитом. Привитые образцы представляли собой остаточный материал от первичных опухолей или метастазов, полученных до или после лечения. Эти ксенотрансплантатные модели (PDX), полученные от пациентов, приживляли без предварительного культивирования в условиях *in vitro* и исследовали для определения гистологических, цитогенетических, генетических и других биологических маркеров, а также их ответа на стандартные способы терапии (SOC).

Модель HBCx-34 PDX происходила из первичной карциномы протоков молочной железы, не подвергавшейся лечению. Модель HBCx-34 PDX имела мутированный ATM (ген, кодирующий белок, участвующий в восстановлении двухцепочечной ДНК) и wt p53, была ER+/PR+, отвечала на доцетаксел, капецитабин, тамоксифен и комбинацию адриамицин/циклофосфамид и имела слабый ответ на летрозол.

Для модели опухоли HBCx-34 потребовалось примерно 35 дней, чтобы получить максимальное количество опухолей в диапазоне от 60 до 200 мм³ и примерно 80 дней, чтобы достичь 2000 мм³ со дня имплантации (с добавлением эстрогена). HBCx-34 не имела явных кахектических свойств, но у мышей, несущих HBCx-34, не наблюдали увеличение массы тела.

MCLA-128 представляет собой биспецифическое антитело IgG1 с усиленной АЗКЦ, которое нацелено на димер HER2:HER3. MCLA-128 демонстрирует эффективность в условиях *in vitro*, которая превосходит эффективность других антител к HER2 и к HER3 в клетках, стимулированных высокими концентрациями херегулина (HRG), что позволяет преодолеть один из механизмов устойчивости к современным видам терапии HER2.

Несущие опухоли мыши получали эстроген, разведенный в питьевой воде (β-эстрадиол, 8,5 мг/л), от даты имплантации опухоли до даты включения. В течение периода лечения мыши не получали эстроген.

Животные и условия содержания

Беспородных бестимусных (*tu/tu*) самок мышей («HSD : Athymic Nude-Foxn1^{nu}») массой 18-25 грамм (Harlan Laboratories, Gannat, Франция) размещали для акклиматизации в виварии с неограниченным доступом к пище и воде на по меньшей мере 6 дней до манипуляции (схема 4-1).

5 *Схема 4-1 Характеристики животных*

Вид	Штамм	Поставщик	Пол	Масса	Возраст при получении
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	Бестимусные голые мыши - Foxn1 ^{nu}	Harlan, France	Самки	18-25	5 недель

Испытываемое соединение и составы

Носитель MCLA-128 был готов к применению, применялся для дозирования с 0 дня по 38 день и хранился при +4°C. Затем с 42 дня по 56 день (конец исследования) в качестве носителя для дозирования и приготовления MCLA-128 применяли 0,9% NaCl (CDM Lavoisier, партия 6F134). Аликвоты 0,9% NaCl (CDM Lavoisier, партия 6F134) готовили еженедельно с 42 дня по 56 день и хранили при +4°C.

Носитель летрозола (CDM Lavoisier, партия 6F134): 0,9% NaCl был готов к применению. Аликвоты 0,9% NaCl (CDM Lavoisier, партия 6F134) готовили еженедельно и хранили при +4°C.

15 MCLA-128 был готов к применению и применялся для инъекций с 0 дня по 42 день. После этого аликвоты MCLA-128 разбавляли в 0,9% NaCl для получения рабочих растворов с концентрацией 2,5 мг/мл, которые готовили перед каждой инъекцией. Их применяли для дозирования с 42 дня по 56 день (конец исследования).

20 Таблетки летрозола (Letrozole Actavis) растворяли в 0,9% NaCl при магнитном перемешивании с образованием конечного раствора с концентрацией 0,25 мг/мл. Раствор для дозирования был стабильным в течение 7 дней и хранился при +4°C в защищенном от света месте.

Индукция трансплантатных моделей опухолей

25 Опухоли одного и того же пассажа трансплантировали подкожно на 6-24 мышей (мышь-доноры, пассаж (n-1)). После того, как эти опухоли достигали 1000-2000 мм³, мышей-доноров умерщвляли путем смещения шейных позвонков, опухоли асептически иссекали и разрезали на части. После удаления некротических участков опухоли разрезали на фрагменты размером приблизительно 20 мм³ и переносили в культуральную среду перед прививкой.

95 мышей подвергали анестезии с применением 100 мг/кг гидрохлорида кетамина (партия 5D92, срок действия: 2017/03, Virbac) и 10 мг/кг ксилазина (партия КР0АХ9Х, срок действия: 2017/08, Bayer), затем кожу асептически обрабатывали раствором хлоргексидина, надрезали на уровне межлопаточной области, и фрагмент опухоли размером 20 мм³ помещали в подкожную ткань. Кожу закрывали зажимами.

У всех мышей из одного эксперимента имплантации проводили в один и тот же день.

Фаза лечения

40 мышей с подкожно растущей опухолью НВСх-34 размером от 62,5 до 256 мм³ распределяли в соответствии с их объемом опухоли, чтобы получить одинаковое среднее значение и медианный объем опухоли в каждой группе лечения. Лечение случайным образом назначали по коробкам, в которых содержалось до 5 мышей, и начинали через 36 дней после имплантации опухоли (уровень включения 42%). Исследование прекращали через 57 дней после начала лечения.

Измерение опухоли и наблюдения за животными

Объем опухоли оценивали путем измерения диаметров опухоли штангенциркулем раз в две недели в течение экспериментального периода.

Использовали формулу $TV \text{ (мм}^3\text{)} = [\text{длина (мм)} \times \text{ширина (мм)}^2] / 2$, где длина и ширина представляют собой самый длинный и самый короткий диаметры опухоли, соответственно.

Всех животных взвешивали раз в две недели в течение экспериментального периода.

Токсичность различных способов лечения определяли следующим образом: процент потери массы тела (% BWL) = $100 - (\text{среднее значение } BW_x / \text{среднее значение } BW_0 \times 100)$, где BW_x представляет собой среднее значение BW в любой день во время лечения и BW_0 представляет собой среднее значение BW в 1 день лечения.

Всего применяли 4 группы, как обобщено на схеме ниже. Каждая группа изначально включала 10 мышей.

Группа	Кол-во включенных мышей	Испытываемое изделие	Среднее значение (мм ³)	Медиана (мм ³)	Ст.ошиб.сред. (мм ³)
1	10	Носитель MCLA-128	126,9	117,0	16,52
2	10	MCLA-128 25 мг/кг	124,4	117,0	13,31
3	10	Летрозол 2,5 мг/кг	126,9	117,0	16,92

4	10	MCLA-128 25 мг/кг Летрозол 2,5 мг/кг	123,1	126,0	19,72
---	----	--	-------	-------	-------

В группе 1 носитель MCLA-128 и носитель летрозолола вводили в дозе 10 мл/кг в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 и п/о 1 р./сутки в течение 57 дней (qdx57), соответственно;

В группах 2 и 4 MCLA-128 вводили в дозе 25 мг/кг в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56;

В группах 3 и 4 летрозол вводили в дозе 2,5 мг/кг п/о 1 р./сутки в течение 57 дней.

Все дозы лечения корректировали на массу тела при каждой инъекции.

Доза и схемы дозирования в исследовании эффективности XTS-1521

Группа	N	1 лекарственное средство/испытуемый агент					2 лекарственное средство/испытуемый агент				
		Агент	Доза, мг/кг	Путь	Объем, мл/кг	Схема	Агент	Доза, мг/кг	Путь	Объем, мл/кг	Схема
1	10	Носитель MCLA-128	-	в/б	10	D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56	Носитель летрозолола ^	-	п/о	10	1 р./сутки в течение 57 дней*
2	10	MCLA-128	25	в/б	10	См. выше	-	-	-	-	-
3	10	-	-	-	-	-	Летрозол	2,5	п/о	10	1 р./сутки в течение 57 дней*
4	10	MCLA-128	25	в/б	10	См. выше	Летрозол	2,5	п/о	10	1 р./сутки в течение 57 дней*

(*) 1 р./сутки в течение 57 дней: с D0 по D56.

(^) Носитель летрозолола = 0,9% NaCl

Результаты

Среднее процентное изменение массы тела в течение периода лечения показано на Фигуре 3.

В группе 1 носитель MCLA-128, введенный в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56, и носитель летрозол, введенный п/о 1 р./сутки в течение 57 дней, оба введенные из расчета 10 мл/кг, хорошо переносились с 0,4% максимальной средней потери массы тела на 4 день и 3,7% максимальной индивидуальной потери массы тела на 49 день.

В группе 2 MCLA-128, введенный в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 в дозе 25 мг/кг, введенный из расчета 10 мл/кг, хорошо переносился с 0,4% максимальной средней потери массы тела на 25 день и 8,3% максимальной индивидуальной потери массы тела на 39 день.

В группе 3 летрозол, введенный в дозе 2,5 мг/кг п/о, введенный из расчета 10 мл/кг 1 р./сутки в течение 57 дней, хорошо переносился без потери средней массы тела и 4,1% максимальной индивидуальной потери массы тела на 4 день.

В группе 4 MCLA-128, введенный в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56, введенный в дозе 25 мг/кг в/б, и летрозол, введенный в дозе 2,5 мг/кг п/о 1 р./сутки в течение 57 дней, оба введенные из расчета 10 мл/кг, хорошо переносились с 0,7% максимальной средней потери массы тела на 4 день и 4,2% максимальной индивидуальной потери массы тела на 4 день.

Кривые роста опухоли (средний объем опухоли с течением времени) показаны на Фигуре 1. Значения T/C в процентах для каждой группы лечения указаны в таблице 1 и показаны на Фигуре 2. Определения частичного ответа и полного ответа приведены в таблице 2. Статистический анализ приведен в таблице 3 и таблице 4.

В этом исследовании опухоли измеряли один раз в две недели в течение экспериментального периода.

В группе 2 MCLA-128, в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56, введенный в дозе 25 мг/кг в/б, введенный из расчета 10 мл/кг, не индуцировал статистически достоверное ингибирование роста опухоли с $TGDi = 0,93$, наилучшим $T/C\% = 91,14\%$ на 28 день; $T/C\% = 101,56\%$ (последний день для контрольной группы) и наилучшим $TGI\% = 31,59\%$ в последний день для контрольной группы. Однако наблюдали 1/9 стабилизацию опухоли и 1/9 частичную регрессию опухоли.

В группе 3 летрозол, введенный в дозе 2,5 мг/кг, введенный из расчета 10 мл/кг п/о 1 р./сутки в течение 57 дней, вызывал статистически достоверное ингибирование роста опухоли ($p < 0,001$ по сравнению с группой носителя, критерий Манна-Уитни и $p < 0,05$ по

сравнению с группой контроля согласно критерию Данна) с $TGDi > 1,1$, наилучшим $T/C\% = 18,68\%$ на 56 день (последний день для контрольной группы) и наилучшим $TGI\% = 145,70\%$ на 35 день. Более того, наблюдали 7/10 частичных регрессий опухоли и 1/10 полную регрессию опухоли.

- 5 В группе 4 комбинация MCLA-128, в/б на D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56, введенного в дозе 25 мг/кг в/б, и летрозол, введенного в дозе 2,5 мг/кг, введенных из расчета 10 мл/кг п/о 1 р./сутки в течение 57 дней, индуцировала статистически достоверное ингибирование роста опухоли ($p < 0,001$ по сравнению с группой носителя, критерий Манна-Уитни и критерий Данна) с $TGDi > 1,1$,
10 наилучшим $T/C\% = 9,64\%$ на 56 день (последний день для контрольной группы) и $TGI\% = 169,03\%$ на 32 день. Кроме того, наблюдали 5/10 частичных регрессий опухоли и 5/10 полных регрессий опухоли, с 5/10 выживших без опухолей в конце исследования.

Обсуждение

- 15 На основании данных о массе тела и клинических наблюдений все испытываемые соединения в виде отдельного агента или в комбинации хорошо переносились при испытанных дозах и схемах.

- В модели НВСх-34 MCLA-128 по отдельности не индуцировал ингибирование роста опухоли, тогда как летрозол по отдельности индуцировал статистически достоверное ингибирование роста опухоли. Летрозол в комбинации с MCLA-128 индуцировал
20 статистически достоверное синергическое ингибирование роста опухоли.

- Выбор лечения для пациентов с раком молочной железы осуществляют, исходя из трех биомаркеров: HER2, рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR). Пациенты с сверхэкспрессией HER2 являются подходящими для видов терапии, нацеленных на HER2, таких как трастузумаб и пертузумаб. ER/PR-положительные пациенты будут получать
25 антиэстрогенную терапию или ингибиторы ароматазы. Антиэстрогены (такие как тамоксифен и фулвестрант) модулируют активность ER, в то время как ингибиторы ароматазы (ИА, такие как летрозол или экземестан) ингибируют превращение андрогенов в эстрогены, истощая уровни стимулов ER у пациентов. Антиэстроген и ингибиторы ароматазы применяют в различных популяциях пациентов с ER+ раком молочной железы,
30 например, ИА применяют в качестве лечения первой линии у пациентов в постменопаузе. В примере 2 показано, что добавление MCLA-128 как к тамоксифену, так и к фулвестранту усиливает активность антиэстрогенных способов лечения.

Пример 2

- MCLA-128 оценивали в виде монотерапии и в комбинации с SERM тамоксифеном и
35 SERD фулвестрантом (фазлодекс®) в отношении эффективности в ксенотрансплантатной

модели эстроген-чувствительной карциномы молочной железы человека MCF-7 у голых мышей. Дизайн исследования также включал сбор опухолей для последующего анализа.

Обработки начинали на D1 у мышей с развившимися подкожными опухолями MCF-7. Предполагалось, что конечной точкой исследования будет конечная точка объема опухоли 1000 мм³ или 45 дней, в зависимости от того, что наступит раньше. Исследование завершилось на D39, и результат лечения был основан на проценте ингибирования роста опухоли (%TGI), определяемом как разность в процентах между медианными объемами опухоли D25 (MTV) у получивших лечение и контрольных мышей. Для анализа выбрали D25, так как это был последний день перед тем, как животные выбывали из исследования из-за прогрессирования опухоли.

Ответ на лечение определяли на основании анализа процента ингибирования роста опухоли (%TGI), определяемого как разность в процентах между конечными (D25) медианными объемами опухолей (MTV) в получившей лечение и контрольной группах, при этом различия между группами считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$ с применением критерия Манна-Уитни. Также учитывали регрессию опухоли, средний рост опухоли и переносимость лечения.

Мыши

Самки бестимусных голых мышей (Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}, Charles River) были в возрасте десяти недель и имели массу тела от 19,2 до 30,5 г на D1 исследования. Животные получали без ограничений воду (обратный осмос, 1 м.д. Cl) и модифицированный NIH 31 и облученный Lab Diet[®] корм, состоящий из 18,0% сырого белка, 5,0% сырого жира и 5,0% сырого волокна. Мышей помещали на облученные подстилки Enrich-o-cobs[™] для лабораторных животных в статических микроизоляторах при 12-часовом световом цикле, 20-22°C (68-72°F) и влажности 40-60%.

Имплантация опухоли

За три дня до имплантации опухолевых клеток гранулы эстрогена (0,36 мг эстрадиола, 60-дневное высвобождение, Innovative Research of America, Сарасота, Флорида, США) имплантировали подкожно между лопатками всех испытываемых животных с применением стерилизованного троакара.

Ксенотрансплантаты инициировали с применением культивированных клеток карциномы молочной железы человека MCF-7. Опухолевые клетки выращивали до средней логарифмической фазы в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 единиц/мл пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 0,075% бикарбоната натрия и 25 мкг/мл гентамицина. В день имплантации опухолевых клеток клетки трипсинизировали, осаждали и ресуспендировали

в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в концентрации 1×10^8 клеток/мл. Каждая испытываемая мышь получила 1×10^7 клеток MCF-7, имплантированных подкожно в правый бок, и рост опухоли контролировали по мере того, как их средний объем приближался к желаемому диапазону от 100 до 150 мм³.

Через девятнадцать дней после имплантации опухолевых клеток, обозначенной как D1 исследования, мышей определяли в шесть групп по 15 животных и четыре группы по шесть животных. Индивидуальные объемы опухолей колебались в диапазоне от 75 до 196 мм³, и средние объемы опухолей по группам составили 134-137 мм³ на D1. Массу опухоли оценивали, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли.

Терапевтические агенты

MCLA-128 хранили при 4°C, получали предварительно приготовленным в концентрации 2,5 мг/мл и готовым к введению в дозе 25 мг/кг при объеме дозы 10 мл/кг и защищали от света во время хранения и манипуляций. Тамоксифен (Sigma-Aldrich, серия № WXBB5732V) получали в виде порошка и хранили при 4°C в защищенном от света месте. Каждую неделю готовили 5 мг/мл раствор для дозирования в кукурузном масле, и каждая мышь получала 0,2 мл для дозы 1 мг/животное. Раствор для дозирования хранили при 4°C. Фазлодекс[®], торговое наименование фулвестранта (AstraZeneca, серия № LV032, LW466 и LX432), получали в виде маточного раствора 50 мг/мл, который хранили при 4°C. В каждый день дозирования маточный раствор разводили в кукурузном масле до 25 мг/мл, и каждая мышь получала 0,2 мл для дозы 5 мг/животное.

Лечение

Группы 1 и 7 использовались в качестве контролей эффективности и для отбора проб, соответственно, и получали внутрибрюшинно (в/б) носитель MCLA-128 на D1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 и 29 и кукурузное масло подкожно (п/к) через день, чтобы получить пятнадцать доз (1 раз каждые 2 дня $\times$ 15 (qod $\times$ 15)). Группам 2 и 8 вводили MCLA-128 в дозе 25 мг/кг в/б по той же схеме, как и носитель MCLA-128. Группам 3 и 9 вводили фазлодекс[®] в дозе 5,0 мг/животное, п/к, один раз в неделю в течение пяти недель (1 р./неделю $\times$ 5 (qw $\times$ 5)). Группе 4 вводили тамоксифен в дозе 1 мг/животное, п/к, 1 раз каждые 2 дня $\times$ 15. Группам 5 и 10 вводили MCLA-128 и фазлодекс[®] по схемам, описанным выше. Группа 6 получала MCLA-128 и тамоксифен по схемам, описанным выше.

MCLA-128 вводили в объеме дозы 10 мл/кг, с поправкой на индивидуальную массу тела каждого животного. Фазлодекс[®] и тамоксифен вводили в фиксированном объеме 0,2 мл.

Результаты

На Фигуре 5 представлена диаграмма разброса данных, показывающая распределение опухолей по группам. На Фигуре 6 показаны кривые медианного роста опухолей для всех групп в исследовании.

Рост опухолей MCF-7 у контрольных мышей (группа 1)

5 Мыши группы 1 получали носитель MCLA-128 и кукурузное масло, как указано выше, и использовались в качестве контрольной группы для расчета процента TGI и статистических сравнений. Медианный объем опухоли составил 600 мм³, при этом в этой группе индивидуальные объемы опухолей на D25 колебались в диапазоне от 288 до 936 мм³ (Фигура 5). На момент анализа данных зарегистрировали два случая смерти NTRu на 10 D15 и D21, в результате чего осталось тринадцать оцениваемых животных. Дополнительные случаи смерти NTRu зарегистрировали после D25; один на D26 и два на D35. Все случаи смерти были вызваны предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

Ответ на MCLA-128 (группа 2)

15 В группе 2 MCLA-128 вводили, как указано выше. Это лечение привело к медианному объему опухоли 600 мм³, что соответствует недостоверному 0% TGI относительно контрольной группы ($P>0,05$). На момент анализа данных зарегистрировали шесть случаев смерти NTRu; по два на D17 и D22 и по одному на D19 и D20, в результате осталось девять оцениваемых животных. Дополнительные случаи смерти NTRu 20 зарегистрировали после D25; по одному на D29 и D36. Все случаи смерти были вызваны предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

Ответ на фазлодекс[®] (группа 3)

В группе 3 фазлодекс[®] вводили, как указано выше. В результате этого лечения медианный объем опухоли составил 288 мм³, что соответствует достоверному 52% TGI 25 относительно контрольной группы ($P<0,001$). На D20 и D24 зарегистрировали два случая смерти NTRu, в результате чего осталось 13 оцениваемых животных. Все случаи смерти были вызваны предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

Ответ на тамоксифен (группа 4)

В группе 4 тамоксифен вводили, как указано выше. В результате этого лечения 30 медианный объем опухоли составил 184 мм³, что соответствует достоверному 69% TGI относительно контрольной группы ($P<0,001$). На момент анализа данных зарегистрировали три случая смерти NTRu на D3, D10 и D22, в результате чего осталось двенадцать оцениваемых животных. Два случая смерти также зарегистрировали на D26 35 после временной точки анализа данных. Все случаи смерти были вызваны предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

Ответ на MCLA-128 в комбинации с фазлодексом или тамоксифеном (группы 5 и 6)

В группе 5 MCLA-128 комбинировали с фазлодексом[®] и вводили, как указано выше. В результате этого лечения медианный объем опухоли составил 126 мм³, что соответствует достоверному 79% TGI. Этот результат был достоверным по сравнению с контрольной группой и группой монотерапии MCLA-128 (P<0,001), а также монотерапией фазлодексом[®] (P<0,05). В этой группе зарегистрировали три PR. Один случай смерти NTRu зарегистрировали на D17, в результате чего осталось четырнадцать оцениваемых животных. Этот случай смерти был вызван предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

В группе 6 MCLA-128 комбинировали с тамоксифеном и вводили, как указано. В результате этого лечения медианный объем опухоли составил 108 мм³, что соответствует достоверному 82% TGI. Этот результат был достоверным относительно контроля и монотерапии MCLA-128 (P<0,001), а также монотерапии тамоксифеном (P<0,05). В этой группе зарегистрировали четыре PR. На момент анализа данных зарегистрировали один случай смерти NTRu на D15, в результате чего осталось четырнадцать оцениваемых животных. Три дополнительных случая смерти также зарегистрировали после временной точки анализа данных; два на D30 и один на D39. Эти случаи смерти были вызваны предполагаемой токсичностью, связанной с эстрогенами.

Обсуждение

В этом примере оценивали эффективность агента MCLA-128 по сравнению с фазлодексом[®] и тамоксифеном и в комбинации с ними в ксенотрансплантатной модели эстроген-чувствительной карциномы молочной железы человека MCF-7 у голых мышей. Опухоли измеряли два раза в неделю до D39, и анализ TGI проводили на D25.

На D25 медианный объем опухоли для контрольной группы 1 составил 600 мм³, при этом диапазон индивидуальных размеров опухолей составил от 288 до 936 мм³. Группы, которым вводили MCLA-128, фазлодекс[®] или тамоксифен, имели медианные объемы опухолей 600, 288 и 184 мм³, что соответствует TGI 0, 52 и 69% TGI. Результаты монотерапии MCLA-128 не были достоверными по сравнению с контролем (P>0,05), но результаты для тамоксифена и фазлодекса[®] были достоверными по сравнению с контролем (P<0,001). Лечение MCLA-128 в комбинации с тамоксифеном или фазлодексом[®] привело к медианным объемам опухолей 126 и 108 мм³, что соответствует 79 и 82% TGI, соответственно. Каждый из этих результатов был достоверным по сравнению с контролем и монотерапией MCLA-128 (P<0,001), а также с соответствующими видами терапии тамоксифеном или фазлодексом[®] (P<0,05). Три PR зарегистрировали в группе MCLA-128/фазлодекс[®], и четыре PR зарегистрировали в

группе MCLA-128/тамоксифен. Все способы лечения хорошо переносились. Несколько случаев смерти во всех группах были связаны с токсичностью эстрогена. Подытоживая, комбинированная терапия MCLA-128 с применением фазлодекса® или тамоксифена обеспечила значительную синергетическую пользу в отношении выживания по сравнению с соответствующими видами монотерапии в ксенотрансплантатной модели MCF-7 у голых мышей. Все способы лечения приемлемо переносились.

MCLA-128 не проявил противоопухолевую эффективность в виде отдельного агента, в то время как фулвестрант и тамоксифен оба значительно снижали рост опухоли. К концу периода лечения на 25 день комбинированная терапия MCLA-128 с фулвестрантом или тамоксифеном обеспечила значительную пользу в отношении выживаемости по сравнению с соответствующими видами монотерапии (Фигура 5). Интересно отметить, что благоприятный противоопухолевый эффект комбинированного лечения продолжался в течение периода наблюдения без лечения (Фигура 6). Все способы лечения приемлемо переносились.

Пример 3

Фармакодинамический анализ

Раунд 1 анализа VeraTag

Все фиксированные формалином опухоли из примера 2 обрабатывали, чтобы получить блоки FFPE. Начальный анализ VeraTag (раунд 1) выполняли, используя по 3 опухоли на группу.

Перед анализом VeraTag опухоли разрезали и окрашивали гематоксилином-эозином для определения процента опухолевого содержимого. Для полного удаления неопухолевого содержимого применяли микролазерный захват. Начальный раунд анализа включал следующие пять анализов VeraTag: общий HER2, общий HER3, димеры HER2:HER3, комплексы HER3-PI3K и фосфорилированный HER3.

По сравнению с носителем обработка MCLA-128 не оказывала значительного эффекта ни в одном из анализов. Достоверное различие между группами наблюдали только в анализе HER2:HER3, в котором обработка фулвестрантом значительно повышала образование димеров HER2:HER3, а совместная обработка с MCLA-128 обращала уровни димеров HER2:HER3 в сравнении с обработкой опухолей носителем.

Несмотря на отсутствие статистической достоверности, аналогичную тенденцию наблюдали в анализах HER2 и HER3. Поскольку данные включали только три опухоли на группу лечения, чтобы подтвердить, является ли эта тенденция показателем результата, аналогичного наблюдаемому для анализа HER2:HER3, требовалось больше точек данных. Таким образом, оставшиеся опухоли из таблицы 5 включали во второй раунд анализов

VeraTag для общего HER2, общего HER3 и димеров HER2:HER3. Поскольку в анализах фосфо-HER3 и HER3-PI3K не наблюдали значительный эффект фулвестранта или комбинации с MCLA-128, эти анализы не включали в раунд 2.

Раунд 2 анализа VeraTag

5 Опухоли, проанализированные в раунде 1, которые имели оценки, близкие к среднему значению конкретных анализов, включали в раунд 2 для оценки воспроизводимости между анализами и для обеспечения возможности объединения данных двух независимых экспериментов. Результаты для этих опухолей, проанализированных в обоих раундах, хорошо коррелировали между анализами с
10 коэффициентом вариации (КВ) ниже 20%, за исключением опухоли «Gr.7 An.3», которая была исключена из окончательного анализа (Фигура 7).

Данные обоих раундов объединяли, и результаты подтвердили, что фулвестрант достоверно индуцировал димеризацию HER2:HER3 по сравнению с носителем, и что совместное введение MCLA-128 обращало это действие (Фигура 8).

15 Кроме того, уровни экспрессии HER2 в группе фулвестранта были значительно выше, чем в группах, получавших MCLA-128 по отдельности или в виде комбинированной терапии. Группа, получавшая носитель, имела некоторые различия между образцами и не имела достоверных различий с группой фулвестранта. Наконец, экспрессия HER3 значительно не изменялась между разными группами лечения, несмотря
20 на то, что в группе фулвестранта наблюдали незначительное увеличение HER3 по сравнению со всеми другими группами.

Анализ RPPA

Опухоли из групп 1-6 собирали, когда они достигли максимально переносимого объема, или в конце эксперимента на 39 день, то есть через 10 дней после введения
25 последней дозы. По шесть опухолей на группу лечения включали в анализ с применением массива белков с обращенной фазой (RPPA). Отбор опухолей проводили так, чтобы средний размер опухоли в 6 образцах был близок к размеру для всей группы. Анализ RPPA выполняли следующим образом: опухоли разрезали и помещали на предметные стекла для иммуногистохимии. Стромальное и воспалительное содержимое подвергали
30 макродиссекции для очистки опухолевых клеток. Получали белковые лизаты, и содержание белка определяли количественно. Образцы белка затем наносили в виде пятен на покрытые нитроцеллюлозой стекла в четырех повторах в двух разных концентрациях и затем инкубировали с первичными антителами, специфичными для Akt, ERK, HER2 и HER3, в их общей или фосфорилированной формах.

Данные массива белков с обращенной фазой (RPPA) анализировали с применением однофакторного дисперсионного анализа для выявления достоверных различий между группами лечения и группой носителя. Уровни общего и фосфорилированного Akt были повышены в группе фазлодекса, в других группах не наблюдали достоверных различий.

- 5 Уровни общего ERK были повышены только в группах, получавших один агент, в других группах или в анализе фосфорилированного ERK не было обнаружено каких-либо различий. Уровни общего HER2, но не фосфорилированного HER2, были значительно повышены в группах тамоксифена и фазлодекса. Комбинированное лечение с применением MCLA-128 и гормональной терапии предотвращало эту индукцию
- 10 экспрессии HER2. Уровни общего HER3 были значительно повышены только в группе фазлодекса и снижены при комбинированном лечении MCLA-128.

Обсуждение

Фармакодинамический анализ

- Результаты анализа VeraTag выявили значительно более высокие уровни экспрессии
- 15 HER2 в опухолях мышей, получавших фулвестрант. Оценки в анализе VeraTag коррелировали с HER2-положительным статусом, согласно результатам определения иммуногистохимическим методом (ИГХ): оценки VeraTag для HER2 ниже 10,5 являются отрицательными в ИГХ, оценки от 10,5 до 17,8 являются неоднозначными, а оценки выше
- 20 17,8 являются положительными (Huang et al., 2010 Am J Clin Pathol. 134(2):303-11). Таким образом, по-видимому, лечение фулвестрантом может изменить HER2-статус HER2-
- отрицательной опухоли (т.е. оцененной как 0 или 1+ в соответствии с рекомендациями ASCO, Wolff et al. 2013 J Clin Oncol. 31(31):3997-4013) до статуса HER2, который является по меньшей мере неоднозначным (как правило, оценивается как 2+). Наиболее важно, что анализ VeraTag показал, что обработка фулвестрантом индуцирует образование димеров
- 25 HER2:HER3, которое может быть обращено путем добавления MCLA-128 к этой схеме лечения.

Анализ биомаркеров

- Результаты этого набора экспериментов, в которых измеряли уровни панели биомаркеров с применением RPPA, выявили повышение экспрессии Akt, HER2 и HER3 в
- 30 опухолях, обработанных с применением гормональной терапии. Тот факт, что это повышение, индуцированное гормональной терапией, может быть обращено путем совместного введения MCLA-128, свидетельствует о том, что активация сигнального пути с участием Akt связана с активностью димера HER2:HER3, которая, соответственно, являлась мишенью MCLA-128 в этих опухолях. Это согласуется с данными, полученными

из анализа VeraTag, и дополнительно подтверждает благоприятный эффект совместного введения MCLA-128 и гормональной терапии в условиях *in vivo*.

Общие соображения

Повышение экспрессии белка HER2 после обработки фулвестрантом в ксенотрансплантате MCF-7 согласуется с механизмами устойчивости к гормональной терапии, которые наблюдали у пациентов (Osborne and Schiff 2011 Osborne CK, Schiff R. Annu Rev Med. 62:233-47). Также было описано, что фулвестрант повышает экспрессию HER3 в клетках MCF-7 в условиях *in vitro* и *in vivo* (Morrison et al., 2013 J Clin Invest. 123(10):4329-43), которую наблюдали с помощью анализа RPPA, но не с помощью анализа VeraTag. Это может быть связано с разными сроками сбора опухоли (в начале и в конце периода лечения для анализов VeraTag и RPPA, соответственно).

Синергию между MCLA-128 и фулвестрантом можно объяснить повышенным образованием димера HER2:HER3, наблюдаемым в опухолях, полученных от мышей, которых лечили этой комбинацией. Также в опухолях мышей, получавших только фулвестрант, наблюдали повышенное фосфорилирование Akt (анализ RPPA).

Пример 4: исследование MCLA-128/эндокринной терапии фазы II при положительном по рецептору эстрогена метастатическом раке молочной железы (мРМЖ) с низкой экспрессией HER2

Несмотря на то, что в примере описано введение MCLA-128 в комбинации с эндокринной терапией, этот пример не предназначен для ограничения применения конкретных упомянутых терапевтических агентов и применим к раскрытым биспецифическим антителам, связывающим ErbB-2 и ErbB-3, в комбинации с эндокринной терапией.

ЦЕЛИ: мРМЖ, положительный по рецептору эстрогена [ER]/низкая экспрессия HER2): MCLA-128+ эндокринная терапия

Основная цель:

- Оценить эффективность MCLA-128 в комбинации с эндокринной терапией в отношении процента пациентов с клиническим улучшением (CBR) через 24 недели на основании RECIST 1.1 (согласно оценке исследователя) у пациентов с ER-положительным мРМЖ с низкой экспрессией HER2, у которых ранее заболевание прогрессировало при применении этой же эндокринной терапии.

Дополнительные цели:

- Оценить CBR через 24 недели на основании RECIST 1.1 согласно централизованной оценке

- Оценить выживаемость без прогрессирования (PFS) (согласно оценке исследователя и централизованной оценке)
- Оценить частоту объективных ответов (ORR) на основании RECIST 1.1 (согласно оценке исследователя и централизованной оценке)
- 5 • Оценить время с момента ответа (CR или PR) до прогрессирования или случая смерти от основного рака (DoR) на основании RECIST 1.1 (согласно оценке исследователя и централизованной оценке)
- Оценить OS
- Оценить безопасность и переносимость MCLA-128 в комбинации с эндокринной
- 10 терапией.
- Охарактеризовать ФК MCLA-128 в комбинации с эндокринной терапией
- Охарактеризовать иммуногенность MCLA-128 в комбинации с эндокринной терапией.

Исследовательская цель:

- 15 • Оценить потенциальную корреляцию между биомаркерами в образцах опухоли или крови и противоопухолевой активностью (включая HER2, HER3, димеры HER2:HER3, херегулины и другие потенциальные биомаркеры).

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Открытое многоцентровое международное исследование фазы 2 проводили для

20 оценки эффективности комбинаций на основе MCLA-128 в популяции пациентов с ER-положительным метастатическим раком молочной железы (мРМЖ) с низкой экспрессией HER2.

Пациенты имели ER-положительный метастатический рак молочной железы с

низкой экспрессией HER2 (мРМЖ) (иммуногистохимический (ИГХ) 1+ или ИГХ 2+ в

25 комбинации с отрицательным результатом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)), заболевание которых прогрессировало в соответствии с RECIST v1.1 при применении последней линии предшествующей эндокринной терапии (вводимой по меньшей мере 12 недель), которая включала ингибитор ароматазы или фулвестрант.

Пациенты, подходящие для включения в исследование, должны были получить 1 или

30 2 линии предшествующей эндокринной терапии при метастазировании рака и иметь прогрессирующее заболевание (согласно RECIST v1.1) во время приема ингибитора циклинзависимой киназы (по любой линии).

Для зачисления в исследование статус HER2 и HR и радиологическая документация

предшествующего прогрессирования основывались на медицинских записях. Пригодность

35 к включению в исследование подтверждали как можно скорее для статуса HER2/HR на

основании централизованных лабораторных оценок и для предшествующего прогрессирования заболевания на основании централизованной оценки данных визуализирующих методов. Данные пациентов, ретроспективно признанных не подходящими для включения в исследование, не оценивались для основной цели и могли
5 быть заменены.

MCLA-128 вводили в комбинации с той же предшествующей эндокринной терапией, при которой прогрессирующее заболевание было рентгенологически подтверждено. Включали в общей сложности до 40 пациентов, подходящих для оценки эффективности.

См. Фигуру 12.

ПОПУЛЯЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Критерии включения

Для включения в исследование пациенты должны были соответствовать следующим требованиям:

1. Подписанное информированное согласие до начала любых процедур
15 исследования.

2. Женщины с гистологически или цитологически подтвержденным раком молочной железы с признаками метастатического или местно-распространенного заболевания, не поддающегося никакой местной терапии с лечебными намерениями:

a. Подтвержденный положительный статус рецептора гормона
20 (положительный по рецептору эстрогена [ER+] и/или положительный по рецептору прогестерона [PR+]), включая $\geq 1\%$ положительно окрашенных клеток, на основании анализа самой последней биопсии опухоли.

b. Подтвержденный низкий уровень экспрессии HER2, определенный как ИГХ HER2 1+ или ИГХ HER2 2+, в комбинации с отрицательным FISH, на основании
25 местного анализа недавней биопсии опухоли или архивной биопсии, собранной за 12 месяцев до скрининга (предпочтительно метастатической, в противном случае первичной).

c. Одна или две линии предшествующей эндокринной терапии (ингибитором ароматазы или фулвестрантом) при метастатическом заболевании с
30 рентгенологически подтвержденным прогрессированием заболевания при применении последней линии, после по меньшей мере 12 недель терапии.

d. Прогрессирование заболевания при приеме ингибитора циклинзависимой киназы.

e. Получение не более чем одной предшествующей схемы химиотерапии
35 прогрессирующего/метастатического заболевания.

Примечание: женщины в период пре/перименопаузы могут быть зачислены, если они подлежат лечению агонистом релизинг-фактора лютеинизирующего гормона (РФЛГ), гозерелином. Такие пациенты должны были начать лечение гозерелином или альтернативным агонистом РФЛГ по меньшей мере за 4 недели до включения в исследование, и пациенты, которые получали альтернативный агонист РФЛГ до включения в исследование, должны были перейти на гозерелин на время исследования.

3. Измеримое заболевание в соответствии с определением на основании RECIST, версия 1.1 с помощью радиологических методов во время или после применения самой последней линии терапии. Для когорты 2 данные визуализирующих методов должны были быть доступны для централизованной оценки.

4. Возраст ≥ 18 лет при подписании информированного согласия.

5. Общее состояние согласно оценке по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG) 0 или 1.

6. Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 12 недель, согласно оценке исследователя.

7. Фракция выброса левого желудочка (LVEF) $\geq 50\%$ по данным эхокардиограммы (ЕСНО) или многовходной артериографии (MUGA).

8. Надлежащая функция органа:

a. Абсолютное количество нейтрофилов (АН) $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$

b. Гемоглобин ≥ 9 г/дл

c. Тромбоциты $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$

d. Сывороточный кальций в пределах нормы (или скорректированный с помощью добавок)

e. Аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ) $\leq 2,5 \times$ верхний предел нормы (ВПН) и общий билирубин $\leq 1,5 \times$ ВПН (в случаях поражения печени допускалось $\text{АЛТ/АСТ} \leq 5 \times \text{ВПН}$ и общий билирубин в пределах нормы)

f. Креатинин сыворотки $\leq 1,5 \times \text{ВПН}$ или клиренс креатинина ≥ 60 мл/мин, рассчитанный по формуле Кокрофта-Голта или по формуле для модификации диеты при заболеваниях почек (MDRD) для пациентов в возрасте >65 лет (Приложение 19.2).

g. Сывороточный альбумин $>3,0$ г/дл.

ВИДЫ ИССЛЕДУЕМОЙ И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ

MCLA-128: фиксированная доза 750 мг внутривенно в течение 2 часов в 1 день каждые 3 недели (q3w).

Медикаментозная подготовка с применением парацетамола/ацетаминофена, антигистаминных препаратов и кортикостероидов (согласно стандартной практике) являлась обязательной для каждой инфузии MCLA-128.

5 Эндокринная терапия: Пациенты получали ту же дозу и схему, что и при последней линии эндокринной терапии до начала исследования, во время которой заболевание пациента прогрессировало.

СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ

10 Цикл составлял 3 недели (включая когорту 2, которая могла включать дозирование фулвестранта 1 раз в 4 недели). В случае первоначального введения MCLA-128 после начала инфузии применяли 6-часовой период наблюдения и затем 2-часовой для всех последующих введений.

15 Все пациенты получали MCLA-128 в 1 день и затем один раз каждые 3 недели. Применительно к эндокринной терапии пациенты получали ту же дозу и схему, что и при последней линии эндокринной терапии до включения в исследование, во время которой заболевание пациента прогрессировало.

Фулвестрант вводили на 1, 15, 29 день и один раз каждые 28 дней после этого, или терапию ингибитором ароматазы (летрозол, анастрозол и экземестан) вводили ежедневно, начиная с 1 дня.

Введение лечения (все циклы)

20 См. Фигуру 13. В случае первоначального введения MCLA-128 после начала инфузии применяли 6-часовой период наблюдения и затем 2-часовой для всех последующих введений.

25 *Та же самая эндокринная терапия, во время которой заболевание пациента прогрессировало перед включением в исследование. Может быть введена до, во время или непосредственно после инфузии MCLA-128.

Назначение лечения

Не требуется назначение конкретного лечения.

Адаптация лечения

- Не допускалось снижение дозы MCLA-128 или агентов для эндокринной терапии.
- 30 • Инфузию MCLA-128 прерывали в случае связанной с инфузией реакции (IRR) и окончательно останавливали для тяжелых IRR. Для явлений легкой и средней степени тяжести инфузия могла быть возобновлена при 50% скорости инфузии, а продолжительность инфузии могла быть увеличена до 4 часов.
- Введение MCLA-128 могло быть отложено не более чем на 6 недель между
35 инфузиями для лечения нежелательных явлений (НЯ), в частности, при клинически

значимом снижении LVEF, признаках застойной сердечной недостаточности или стойкой диарее 2 или 3-4 степени тяжести.

- Лекарственные средства для гормональной терапии вводили в соответствии с инструкцией по применению (SPC) каждого лекарственного средства.

5 Продолжительность лечения

Исследуемое лечение вводили до момента подтверждения прогрессирующего заболевания (согласно RECIST 1.1), неприемлемой токсичности, отзыва согласия, несоблюдения пациентом требований исследования, решения исследователя (например, ухудшение клинического состояния), прерывания лечения >6 недель подряд, отмены
10 любого исследуемого лекарственного средства. Пациенты находились под наблюдением для обеспечения безопасности в течение по меньшей мере 35±5 дней после последнего введения исследуемого лекарственного средства и до выздоровления/стабилизации связанных видов токсичности, а также для контроля прогрессирования заболевания и статуса выживаемости в течение 12 месяцев.

15 ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ И СОПУТСТВУЮЩАЯ МЕДИКАЦИЯ

Разрешено

- Введение парацетамола/ацетаминофена, антигистаминных препаратов и кортикостероидов было обязательным при каждом введении MCLA-128. В случае IRR или гиперчувствительности пациент находился под контролем в соответствии с местной
20 клинической практикой, согласно клиническим показаниям.

- Все лекарственные средства, необходимые для хорошего самочувствия пациента и которые, как ожидалось, не будут препятствовать оценке исследуемого лекарственного средства, включая поддерживающее лечение симптомов и НЯ или стандартное лечение сопутствующих состояний, применяли по усмотрению исследователя.

- Гозерелин у женщин в пре/перименопаузе, которые начали прием агониста (РФЛГ) за >4 недели до включения в исследование.

Запрещено

- Сопутствующий длительный прием пероральных кортикостероидов (>10 мг/сутки эквивалента преднизона), ингибиторов ФНО-альфа, антител против Т-клеток (из-за риска
30 иммуносупрессии).
- Любые исследуемые лекарственные средства во время исследования или за 4 недели до введения первой дозы исследуемого лечения.
- Системная противоопухолевая терапия (кроме последней эндокринной терапии) во время исследования или в течение 3 недель после введения первой дозы исследуемого
35 лечения.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ/ПЕРЕНОСИМОСТИ

- НЯ (СТСАЕ, версия 4.03), СНЯ
- Лабораторные показатели: гематология, биохимия, коагулограмма, анализ мочи, цитокины

5 • ЭКГ, MUGA/ЕСНО

- История болезни, показатели жизненно важных функций, общее состояние и физическое обследование

- Сопутствующие лекарственные средства

10 • Модификации дозы (снижения, прерывания, задержки), прекращение из-за токсичности

ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Оценка опухоли была основана на КТ/МРТ с контрастом согласно RECIST 1.1 каждые 6 недель после начала лечения. Объективные ответы подтверждали по меньшей мере через 4 недели после первого наблюдения. Централизованную оценку результатов визуализирующих методов независимым рентгенологом выполняли для всех пациентов (скрининг и исследование). Сканирования костей выполняли в соответствии с клиническими показаниями для пациентов с метастазами в костях в начальных условиях или при подозрении на поражение во время исследования.

Опухолевые маркеры (СА15-3, СЕА, СА27-29) оценивали в 1 день каждого цикла.

20 БИОМАРКЕРЫ

Исследуемые биомаркеры-кандидаты оценивали в опухолевой ткани (скрининг, необязательно через 12 недель и ЕОТ) и в крови (перед введением дозы в 1 день каждые 4 цикла и в конце лечения).

25 Опухоль: HER2, HER3, димеризация HER2:HER3, последующие сигнальные белки (например, PIK3CA), херегулин, фосфорилирование HER2, HER3 и белков в сигнальном пути МАРК и АКТ, экспрессия ингибиторов, таких как PTEN, мутации в генах, связанных с раком, включая передачу сигналов с участием HER2 и HER3, слияния гена херегулина.

30 Кровь: полиморфизм рецептора Fcγ, мутации опухолевой ДНК, циркулирующей в плазме крови, исследуемые сывороточные биомаркеры (например, растворимый HER2, херегулин).

ФАРМАКОКИНЕТИКА

Образцы крови собирали для измерения сывороточного MCLA-128. Отбор проб для ФК фулвестранта или ингибиторов ароматазы не выполняли.

Отбор проб для ФК выполняли в следующие моменты времени:

- Цикл 1: 1 день, до введения дозы, EOI и через 2, 4 и 22 часа после EOI, затем в любое время на 8 день;
- Цикл 2, 3, 5: 1 день, до введения дозы, EOI;
- Каждые 4 цикла после этого: до введения дозы;

5 ИММУНОГЕННОСТЬ

Образцы крови (5 мл) собирали у всех пациентов для оценки сывороточных титров антител к MCLA-128 до введения первой дозы в 1 день для циклов 1, 3, 5, каждые 4 цикла после этого и в конце лечения.

Определения

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

CBR: доля пациентов с лучшим общим ответом CR, PR или SD ≥ 24 недель.

ORR: доля пациентов с лучшим общим ответом CR или PR.

15 PFS: время от начала лечения до прогрессирования заболевания согласно данным радиологии или смерти по любой причине.

Отношение PFS: отношение PFS при применении предыдущей схемы к PFS при применении исследуемого лечения.

DoR: время с момента ответа (CR или PR) до прогрессирования или смерти из-за основного рака.

20 OS: время от начала лечения до смерти по любой причине.

Конечные точки

Первичная

CBR на основании оценки исследователя по данным радиологии через 24 недели

Ключевая вторичная конечная точка

25 CBR через 24 недели на основании централизованной оценки и PFS на основании оценки исследователя и централизованной оценки

Другая вторичная конечная точка

Безопасность: частота, тяжесть и взаимосвязь НЯ, отклонений лабораторных показателей, СНЯ, измерений ЭКГ и LVEF и показателей жизненно важных функций

30 *Переносимость:* прекращение приема из-за НЯ, модификации дозы из-за НЯ, иммуногенность и оценки цитокинов

Другая эффективность: DoR, отношение PFS, ORR и OS

Фармакокинетика: C_{max}, C_{0h}, AUC, CL, V_{ss}, t_{max} и t_{1/2} для MCLA-128

Анализируемые популяции

Получившая лечение популяция: пациенты, которые получили хотя бы одну дозу MCLA-128.

Подходящие для оценки эффективности: пациенты, которые получили по меньшей мере 2 полных цикла (6 недель) лечения и прошли оценку в начальных условиях и одну оценку опухоли в ходе исследования, или которые преждевременно прекратили лечение из-за прогрессирования заболевания.

Анализ

Распределение пациентов и демографические показатели анализировали в популяции, получившей лечение, эффективность анализировали в популяции, подходящей для оценки эффективности, и безопасность анализировали в популяции, получившей лечение.

Количественные переменные обобщали с применением описательной статистики. Непрерывные переменные представляли как N, среднее значение и/или медиана, стандартное отклонение, диапазон. Категориальные переменные представляли с применением частот и процентов.

Критерии благоприятной первичной конечной точки: целесообразной считали медиану PFS 5 месяцев, с порогом активности для CBR через 24 недели, установленным 45%.

CBR и ORR обобщены с прилагаемым 90% точным биномиальным ДИ.

Для PFS, OS и DoR функцию выживаемости оценивали с применением множительной оценки Каплана-Мейера; оценки вероятности и 90% ДИ представлены в указанных временных точках; также представлена медианная продолжительность и 90% ДИ. DoR оценивали только для пациентов, ответивших на лечение. Количество и доля любых пациентов с отношением $PFS \geq 1,3$ сведены в таблицу для когорты 2 с 90% точным ДИ.

НЯ сведены в таблицу по предпочтительному термину Медицинского словаря для нормативно-правовой деятельности (MedDRA[®]) и по классу органов в соответствии с частотой и степенью тяжести. Степень тяжести НЯ основана на общей терминологии для нежелательных явлений (CTCAE) 4.03.

ФК, иммуногенность и биомаркеры анализировали централизованно и сообщали по отдельности.

	День																
Критерий множественных сравнений Данна – дисперсионный анализ/критерий Краскела-Уоллса	0	4	7	11	14	18	21	25	28	32	35	39	42	46	49	53	56
Носитель MCLA-128 в сравнении с MCLA-128 25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Носитель MCLA-128 в сравнении с летрозолом 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	**	**	**
Носитель MCLA-128 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	*	**	**	**	***	**	*	*	*
MCLA-128 25 в сравнении с летрозолом 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	*	**	ns	**	**	**	**
MCLA-128 25 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	*	*	ns	*	***	ns	**	*	**	*	**	*	ns	*
Летрозол 2,5 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица 1. Обобщенные данные анализа с применением критерия множественных сравнений Данна по относительной массе тела в модели опухоли НВСх-34 в исследовании эффективности XTS-1521. Групповые сравнения осуществляли с применением критерия множественных сравнений Данна между получившей лечение группой и контрольной группой: ns = недостоверно, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ и *** = $P < 0,001$. Начальный размер группы: 9-10 животных.

Группа	ЛП (1)	Доза (мг/кг)	Путь	Схема	ЛП (2)	Доза (мг/кг)	Путь	Схема	Средний объем опухоли на D0 (мм³)	Медиана TGD×3 (в днях)	TG DI	T/C% (в последний день для контрольной группы)	Наилучший T/C%	Надень	T/C% (в последний день для контрольной группы)	Наилучший T/C%	Надень	T S	P R	C R	TF S	Кол-во мышей
Гр.1	Носитель MCLA -128	-	в/б	D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56	Носитель летрозола	-	п/о	qdx57	126,9	50,93	/	/	/	/	/	/	/	5	0	0	0	10
Гр.2	MCLA -128	25	в/б	D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56	-	-	-	-	124,4	48,64	0,96	101,56%	91,14%	D28	-4,87%	31,59%	D4	1	1	0	0	9
Гр.3	-	-		-	летрозол	2,5	п/о	Qdx	126,9	>56	>1,1	18,68%	18,68%	D5	121,97%	145,7%	D3	1	7	1	1	10

Гр.4	MCLA-128	25	в/б	D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56	л летрозол	2,5	п/о	57 Qdx 57	123,1	>56	>1,1	9,24%	9,24%	6 D5 6	134,67%	169,03%	5 D3 2	0	5	5	5	10
------	----------	----	-----	--	---------------	-----	-----	-----------------	-------	-----	------	-------	-------	--------------	---------	---------	--------------	---	---	---	---	----

Таблица 2. Противоопухолевая активность MCLA-128 при 25 мг/кг, летрозоло 2,5 мг/кг в ксенотрансплантате HBCx-34 в исследовании эффективности XTS-1521.

XenTech T/C = средний объем опухоли у получивших лечение мышей/средний объем опухоли у контрольных мышей ×100 (рассчитано во время первого умерщвления по этическим соображениям в контрольной группе); TGD (задержка роста опухоли) = время, необходимое для того чтобы медианный объем опухоли достиг D0 объема опухоли×5; TGD_I (индекс задержки роста опухоли) = TGD получивших лечение мышей/TGD контрольных мышей; TS (стабилизация опухоли) = количество мышей с постоянным размером опухоли в течение по меньшей мере 6 последовательных измерений; PR (частичная регрессия) = количество мышей с размером опухоли, который меньше исходного размера опухоли в течение по меньшей мере 6 последовательных измерений; CR (полная регрессия) = количество мышей с размером опухоли от 0 до 14 мм³ в течение по меньшей мере 3 последовательных измерений; TFS (выжившие без опухоли) = количество полных регрессий, зарегистрированных до последнего дня группы. Обработки начинали через 36 дней после имплантации.

Критерий Манна-Уитни	День																	
	0	4	7	11	14	18	21	25	28	32	35	39	42	46	49	53	56	Стат.
Носитель MCLA-128 - D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 Носитель летрозолола – qdx57 в сравнении с MCLA-128 25 D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 - - -	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Носитель MCLA-128 - D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 Носитель летрозолола – qdx57 в сравнении с - - - летрозол 2,5 qdx57	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	**	***	***	***	***	***	***	***	***
Носитель MCLA-128 - D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 Носитель летрозолола – qdx57 в сравнении с MCLA-128 25 D0, D3, D7, D10, D14, D17, D21, D24, D28, D31, D35, D38, D42, D45, D49, D52, D56 летрозол 2,5 qdx57	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Таблица 3. Обобщенные результаты анализа с применением критерия Манна-Уитни по объему опухоли в модели опухоли НВСх-34 в исследовании эффективности XTS-1521.

Групповые сравнения проводили с применением непараметрического критерия Манна-Уитни между получившей лечение группой и контрольной группой: ns = недостоверно, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ и *** = $P < 0,001$. Начальный размер группы: 9-10 животных.

	День																
Критерий множественных сравнений Данна – дисперсионный анализ/критерий Краскела-Уоллса	0	4	7	11	14	18	21	25	28	32	35	39	42	46	49	53	56
Носитель MCLA-128 в сравнении с MCLA-128 25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Носитель MCLA-128 в сравнении с летрозолом 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*
Носитель MCLA-128 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***
MCLA-128 25 в сравнении с летрозолом 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	**	**
MCLA-128 25 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***
Летрозол 2,5 в сравнении с MCLA-128 25/летрозол 2,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Таблица 4. Обобщенные результаты анализа с применением критерия множественных сравнений Данна по объему опухоли в модели опухоли НВСх-34 в исследовании эффективности XTS-1521. Групповые сравнения проводили с применением критерия множественных сравнений Данна между получившей лечение группой и контрольной группой: ns = недостоверно, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ и *** = $P < 0,001$.

5 Начальный размер группы: 9-10 животных.

Идентиф. номер образца	Масса (мг)	Объем (мм ³)
GR.7 AN.1	177,2	288
GR.7 AN.2	198,8	365
GR.7 AN.3	150	256
GR.7 AN.4	138,8	196
GR.7 AN.5	306,6	320
GR.7 AN.6	283,7	405
GR.8 AN.1	120,5	144
GR.8 AN.2	98,2	256
GR.8 AN.4	135,5	221
GR.8 AN.5	314	288
GR.8 AN.6	207,7	320
GR.9 AN.1	137,9	196
GR.9 AN.2	140,1	172
GR.9 AN.3	174,4	196
GR.9 AN.5	119,7	144
GR.9 AN.6	117,3	196
GR.10 AN.1	110,1	172
GR.10 AN.2	162,2	196
GR.10 AN.3	190,3	320
GR.10 AN.4	150,9	196
GR.10 AN.6	162,3	196

Таблица 5. Значения массы и объема ксенотрансплантатов опухоли MCF-7, полученных в Charles River для фармакодинамического анализа. Опухоли, выделенные красным цветом, были включены в первый раунд анализа VeraTag.

Список сокращений в Примере 1

bid: 2 р./сутки

BW: масса тела

BWL: потеря массы тела

5 С: контрольные мыши

CR: полная регрессия опухоли

inj: инъекция

в/в: внутривенно

в/б: внутрибрюшинно

10 IVC: индивидуально вентилируемые клетки

кг: килограмм

мг: миллиграмм

мл: миллилитр

mut: мутированный

15 ns: недостоверно

п/о: перорально, через рот (через желудочный зонд)

PR: частичная регрессия опухоли

PSU: полисульфон

QD: Que die, каждый день

20 Qwk: 1 раз в неделю

RBW: относительная масса тела

RTV: относительный объем опухоли

S: достоверно

п/к: подкожно

25 ст.ошиб.сред.: стандартная ошибка среднего

SoC: стандарт ухода

T: получившие лечение мыши

TGD: задержка роста опухоли

TGDI: индекс задержки роста опухоли

30 TGI: ингибирование роста опухоли

TFS: выживаемость без опухоли

TS: стабилизация опухоли

% T/C: процентное изменение объема опухоли в получившей лечение группе по сравнению с контрольной группой

35 мкл: микролитр

qd : ежедневно

Список сокращений в Примере 2

BW: масса тела

CR: полная регрессия опухоли

5 D: день исследования

в/б: внутрибрюшинный (внутрибрюшинно)

MTD: максимальная переносимая доза

MTV: медианный объем опухоли

NTR: не связанный с лечением

10 PR: частичная регрессия опухоли

qod×15: дозирование через день для получения пятнадцати доз

qwk×5: еженедельное дозирование в течение пяти недель

п/к: подкожно

TGI: ингибирование роста опухоли

15 TR: связанная с лечением смерть

Список сокращений в Примере 4

НЯ: нежелательные явления

АЛТ: аланинаминотрансфераза

АНК: абсолютное количество нейтрофилов

20 АСТ: аспартатаминотрансфераза

AUC: площадь под кривой

CBR: процент пациентов с клиническим улучшением

ЗСН: застойная сердечная недостаточность

CR: полная регрессия опухоли

25 DoR: время с момента ответа (CR или PR) до прогрессирования или смерти из-за
основного рака.

ECHO: эхокардиограмма

ER: рецептор эстрогена

FISH: флуоресцентная гибридизация *in situ*

30 ИГХ: иммуногистохимия

IRR: связанная с инфузией реакция

мРМЖ: метастатический рак молочной железы

MDRD: модификация диеты при заболеваниях почек

MUGA: многоходовая ангиография

35 LVD: дисфункция левого желудочка

LVEF: фракция выброса левого желудочка

РФЛГ: релизинг-фактор лютеинизирующего гормона

PFS: выживаемость без прогрессирования

PR: рецептор прогестерона или частичная ремиссия в зависимости от контекста

5 OCOG: Восточная объединенная группа онкологов

ORR: частота объективного ответа

OS: время от начала лечения до смерти по любой причине.

SPC: инструкция по применению лекарственного средства

ВПН: верхний предел нормы

10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, комбинации терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство для эндокринной терапии содержит ингибитор ароматазы; селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM); или селективный подавитель рецептора эстрогена (SERD).
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство для эндокринной терапии содержит селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM), выбранный из группы, состоящей из тамоксифена (нолвадекса), бромпарестрола (акнестрола), циклофенила (сексовида), ралоксифена (эвиста) и торемифена (фарестона).
4. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство для эндокринной терапии содержит тамоксифен или фулвестрант.
5. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство для эндокринной терапии содержит летрозол.
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона.
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору эстрогена.
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору прогестерона.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой иммуногистохимический ErbB-2+ рак или иммуногистохимический ErbB-2++ рак без амплификации гена ErbB-2.
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой ER-положительный метастатический рак молочной железы с низкой экспрессией HER2 мРМЖ ИГХ 1+ или ИГХ 2+ в комбинации с отрицательным FISH.
11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное биспецифическое антитело может снижать индуцированную лигандом рецепторную функцию ErbB-3 на ErbB-2 и ErbB-3-положительной клетке.
12. Способ лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы, где указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, комбинации терапевтически эффективного количества антитела к ErbB-2 и/или ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии, причем указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2, ErbB-3.
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой иммуногистохимический ErbB-2+ рак или иммуногистохимический ErbB-2++ рак без амплификации гена ErbB-2.
14. Способ по п. 12 или 13, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой ER-положительный метастатический рак молочной железы с низкой экспрессией HER2 мРМЖ ИГХ 1+ или ИГХ 2+ в комбинации с отрицательным FISH.
15. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий введение пациенту ингибитора циклинзависимой киназы 4/6.
16. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный субъект получал один или более вариантов эндокринной терапии до начала лечения с применением указанного биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и указанного терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии.

17. Способ лечения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный субъект получал ингибитор циклинзависимой киназы до начала лечения с применением указанного биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и указанного терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной
5 терапии.
18. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий определение уровня экспрессии рецептора эстрогена, ErbB-2, ErbB-3 или их комбинации на клетках указанного рака.
19. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что
10 указанный субъект имеет положительный статус по рецептору гормона (положительный по рецептору эстрогена [ER+] и/или положительный по рецептору прогестерона [PR+]) для $\geq 1\%$ положительных клеток, определенный иммуногистохимическим методом на биопсии опухоли.
20. Способ по любому из пп. 12-19, отличающийся тем, что указанное антитело
15 представляет собой биспецифическое антитело к ErbB-2/ErbB-3.
21. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий сайт для ErbB-2 может связываться с доменом I или доменом IV ErbB-2.
22. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что
20 указанный антигенсвязывающий сайт для ErbB-3 может связываться с доменом III ErbB-3.
23. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий сайт для ErbB-3 может препятствовать связыванию лиганда ErbB-3 с ErbB-3.
24. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что
25 указанный антигенсвязывающий сайт для ErbB-2 может связывать домен I ErbB-2 и антигенсвязывающий сайт для ErbB-3 может связывать домен III ErbB-3.
25. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное антитело содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-2-специфичной вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из
30 MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916,

MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 и MF1898, изображенных на Фигуре 10, или причем 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 MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 или MF1898.

26. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное антитело содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-3-специфичной 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 10 или Фигуре 11, или причем 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 или MF6074.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное антитело содержит вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-2-специфичной вариабельной области тяжелой цепи MF3958, изображенной на Фигуре 10, или последовательности CDR, которые отличаются не более чем 3 аминокислотами, предпочтительно не более чем 2 аминокислотами, предпочтительно не более чем 1 аминокислотой от последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3958, и вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 ErbB-3-специфичной вариабельной области тяжелой цепи MF3178, изображенной на Фигуре 10, или 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 MF3178.

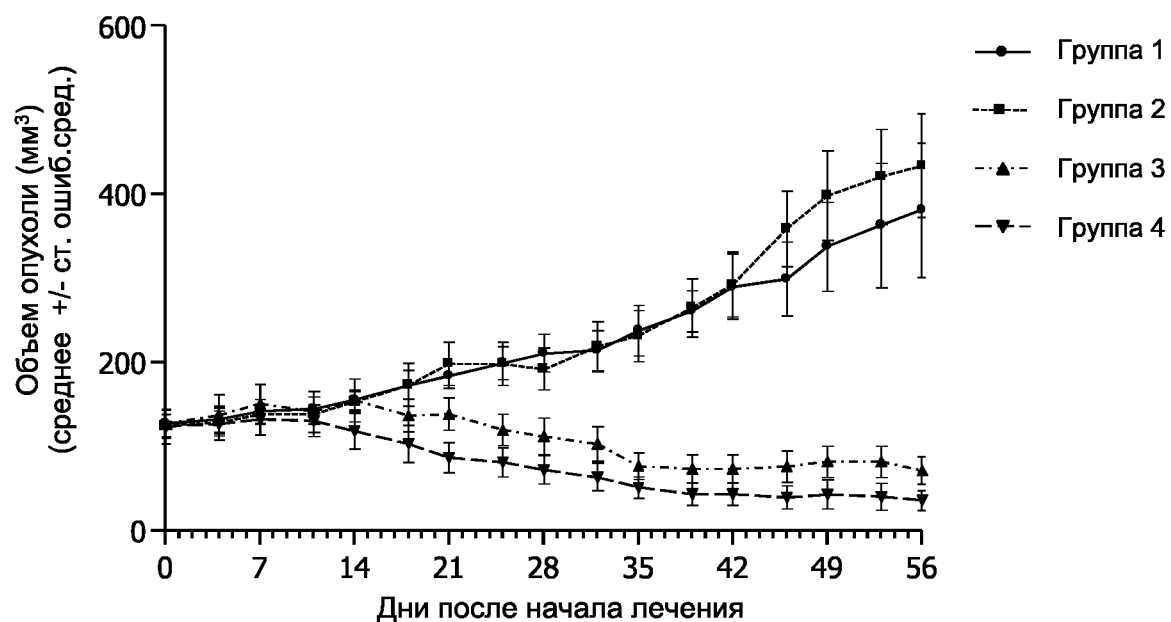
28. Способ лечения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное биспецифическое антитело к ErbB-2/ErbB-3 вводят в виде внутривенной дозы от примерно 300 до примерно 900 мг, например, каждые две-четыре недели.

29. Биспецифическое антитело к ErbB-2/ErbB-3 и терапевтически эффективное количество лекарственного средства для эндокринной терапии для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

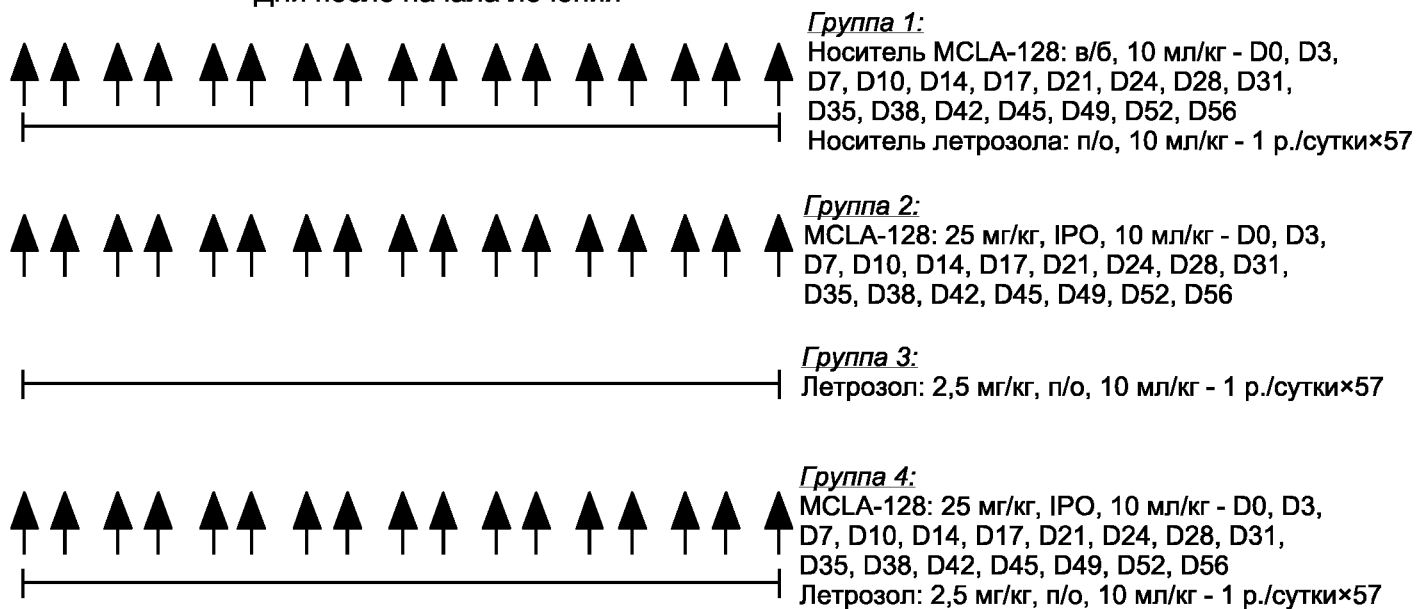
30. Антитело к ErbB-2 и/или к ErbB-3 и терапевтически эффективное количество лекарственного средства для эндокринной терапии для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, и при этом указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2, ErbB-3.

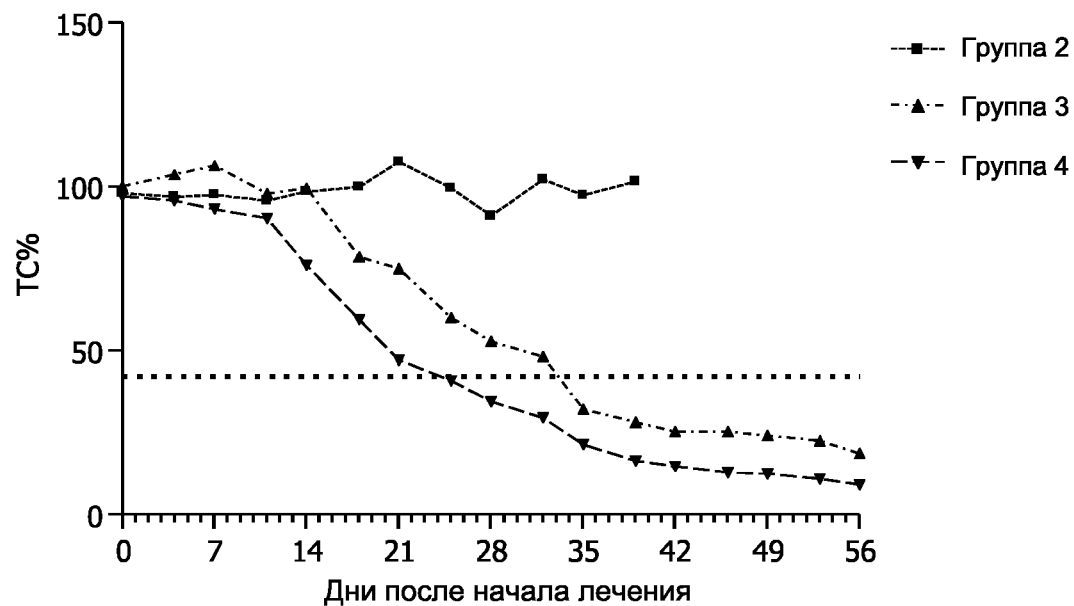
31. Применение биспецифического антитела к ErbB-2/ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии при изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанное биспецифическое антитело имеет антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-2, и антигенсвязывающий сайт, который может связывать внеклеточную часть ErbB-3.

32. Применение антитела к ErbB-2 и/или к ErbB-3 и терапевтически эффективного количества лекарственного средства для эндокринной терапии при изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения субъекта, страдающего от рака молочной железы или подверженного риску развития указанного рака, причем указанный рак молочной железы представляет собой рак молочной железы, положительный по рецептору гормона, и при этом указанное антитело ингибирует димеризацию ErbB-2, ErbB-3.

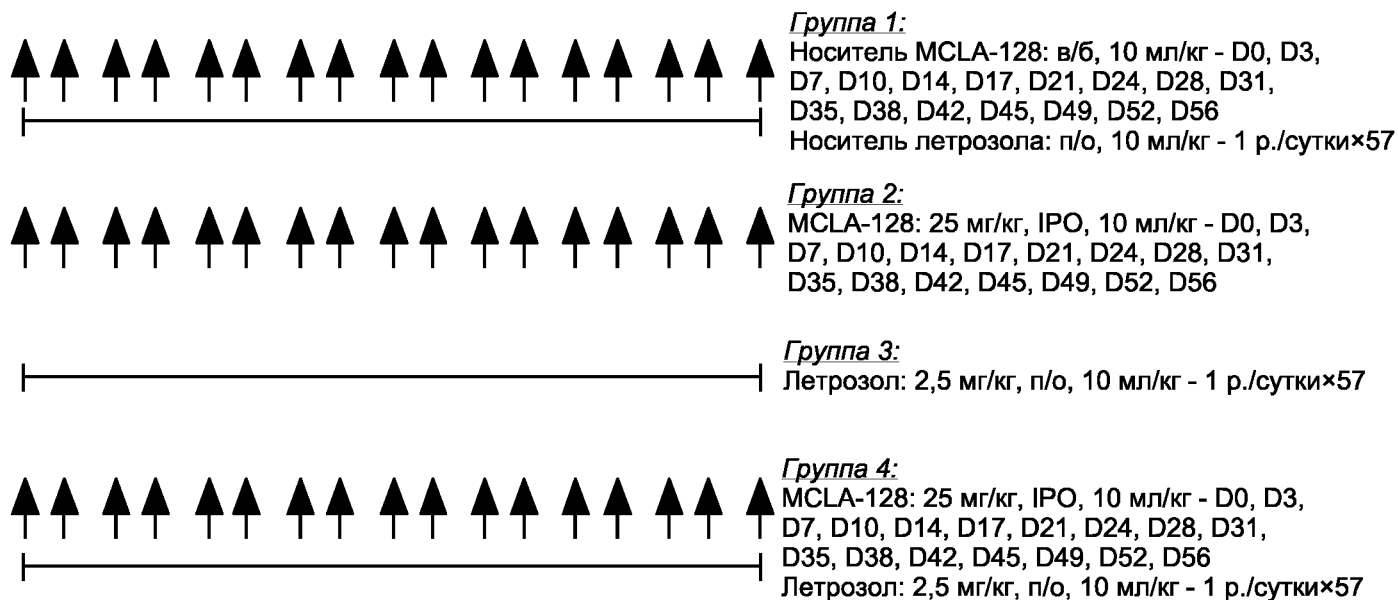


Фиг. 1



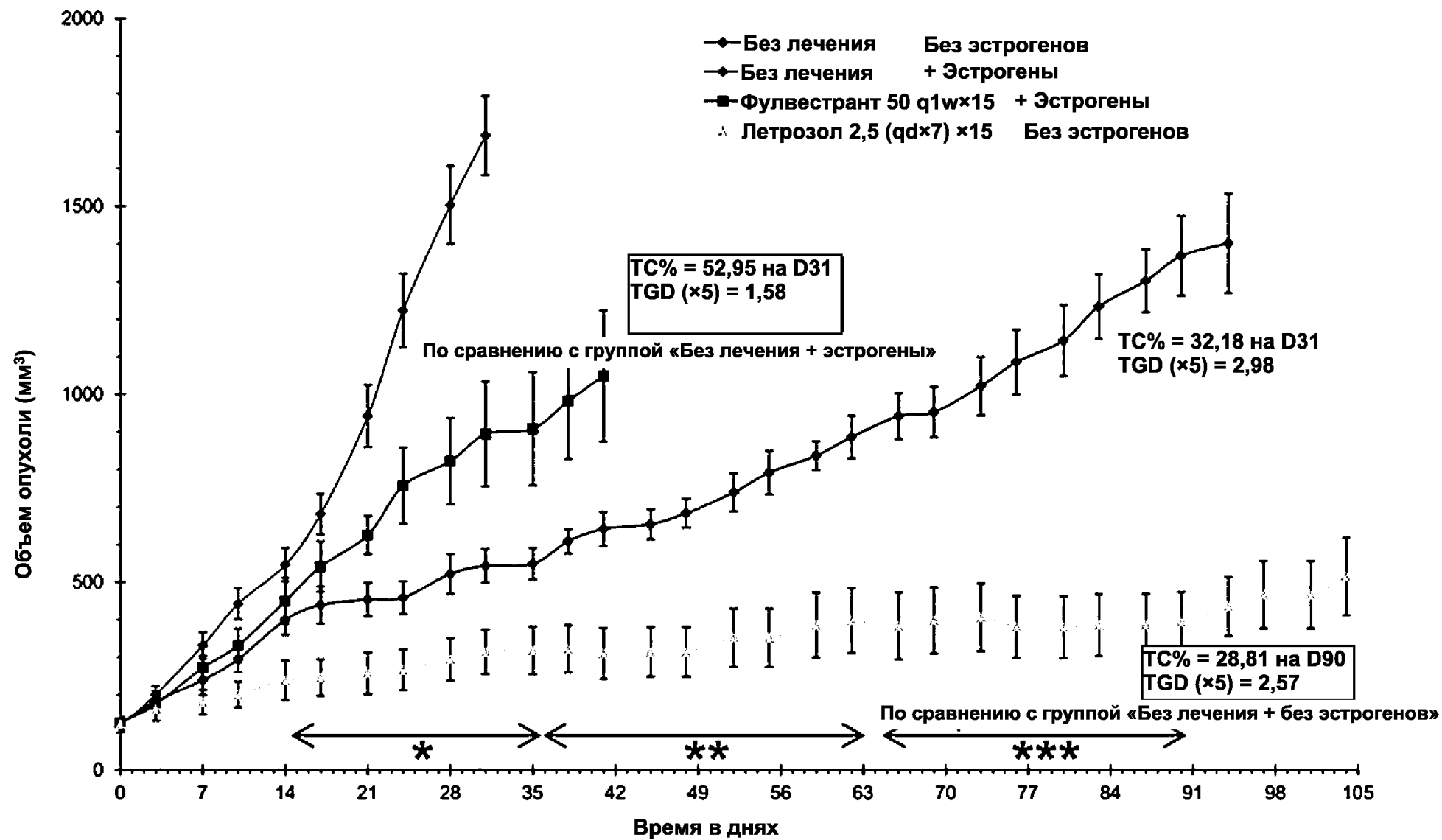


Фиг. 2

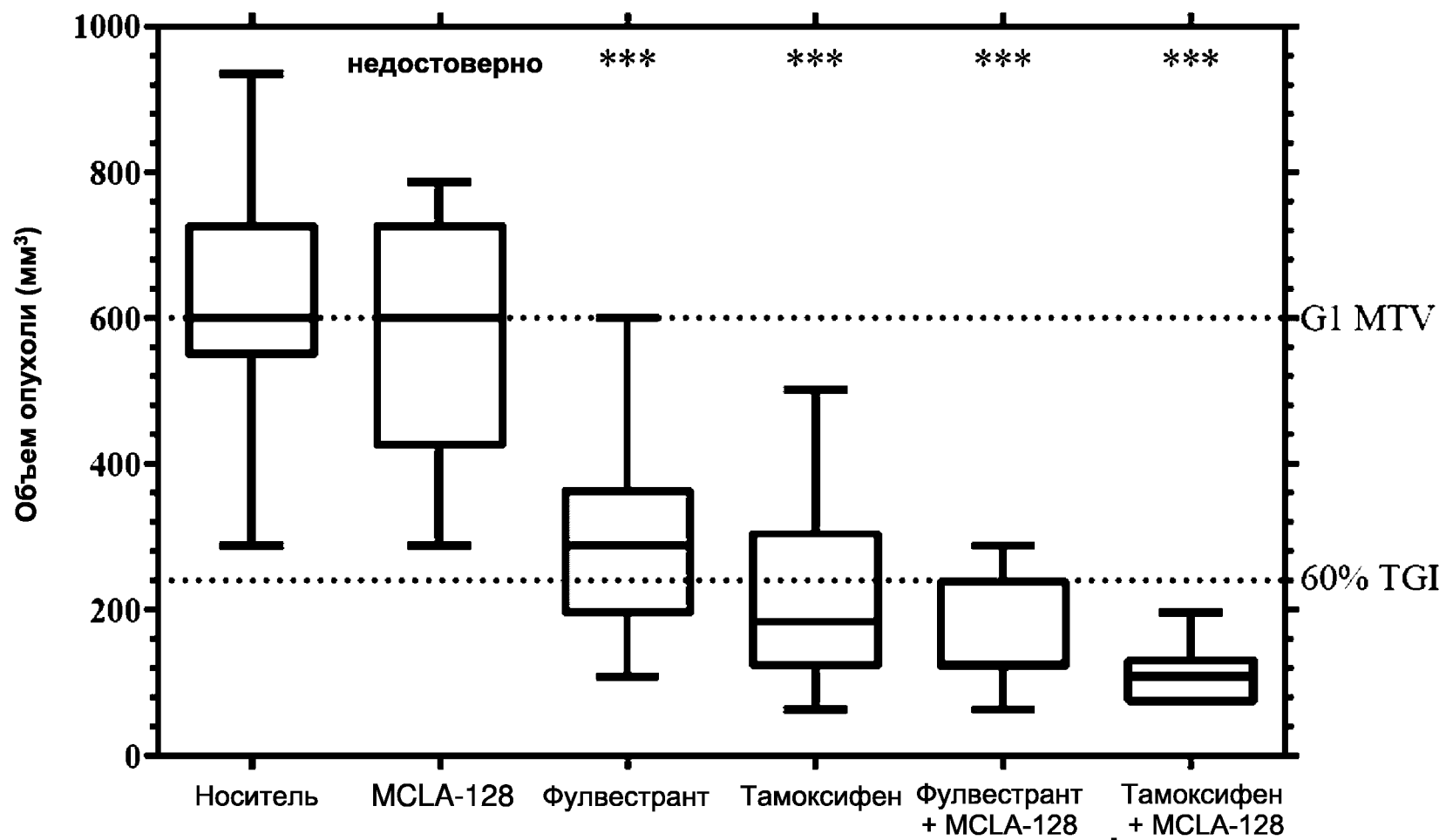


Код опухоли	Экспрессия белка согласно ИГХ			
	Ki67 (человека)	ER (человека)	PR (человека)	Her2 (человека)
НВСх-34	$46\% \pm 3$	$^{+}$ $(80\% \pm 24)$	$^{+}$ $(47\% \pm 39)$	2+

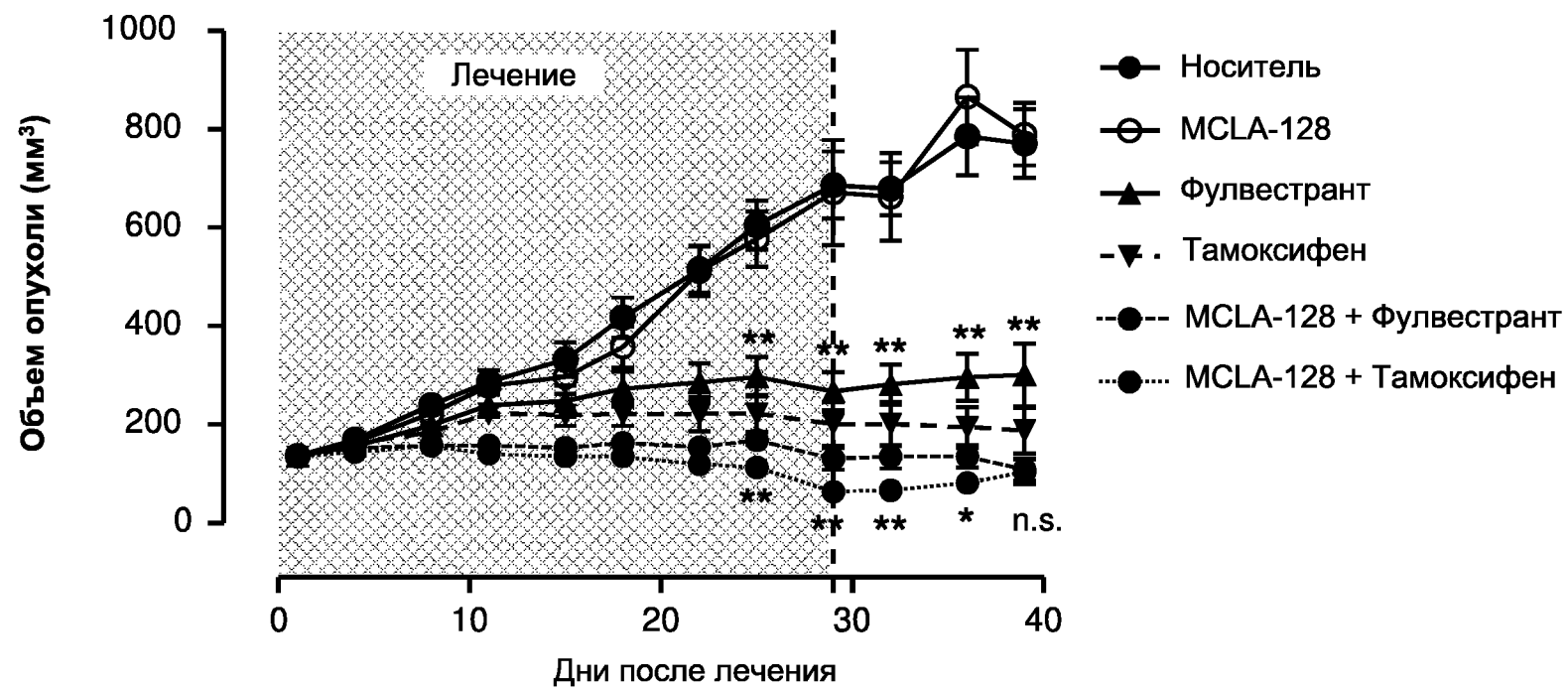
Фиг. 4А



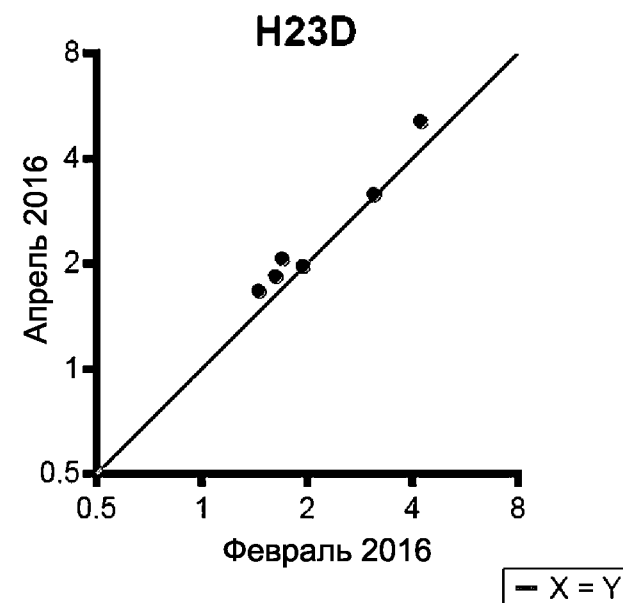
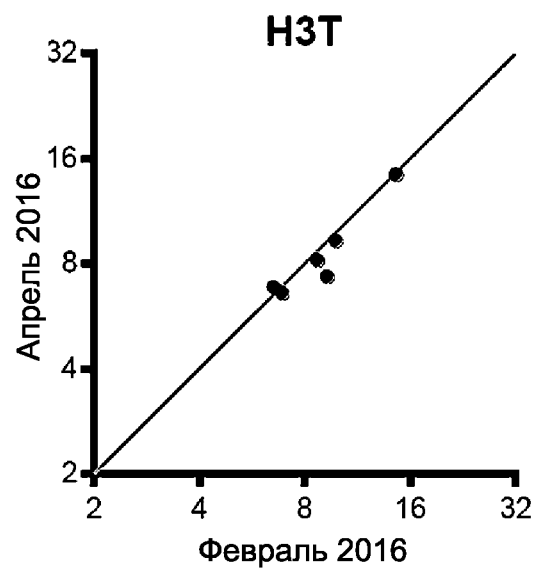
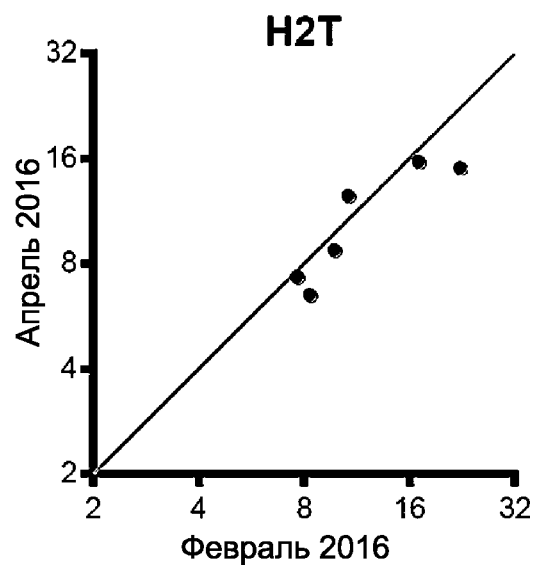
Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6

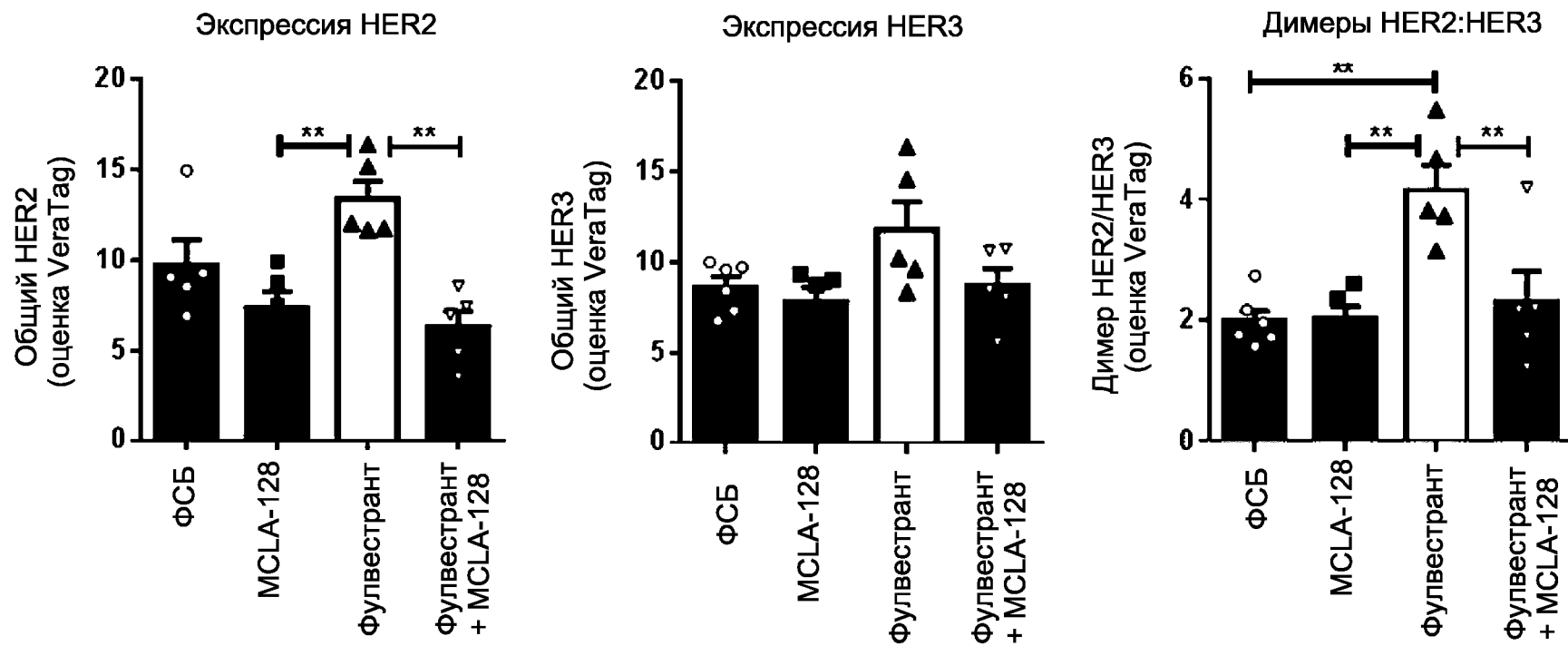


№ образца	H2T		KB%
	Февр. 2016	Апр. 2016	
Gr.7 An.1	9,75	8,79	7%
Gr.7 An.3	22,27	15,09	27%
Gr.8 An.5	7,63	7,37	2%
Gr.9 An.1	16,98	15,73	5%
Gr.9 An.3	10,66	12,57	12%
Gr.10 An.2	8,30	6,53	17%

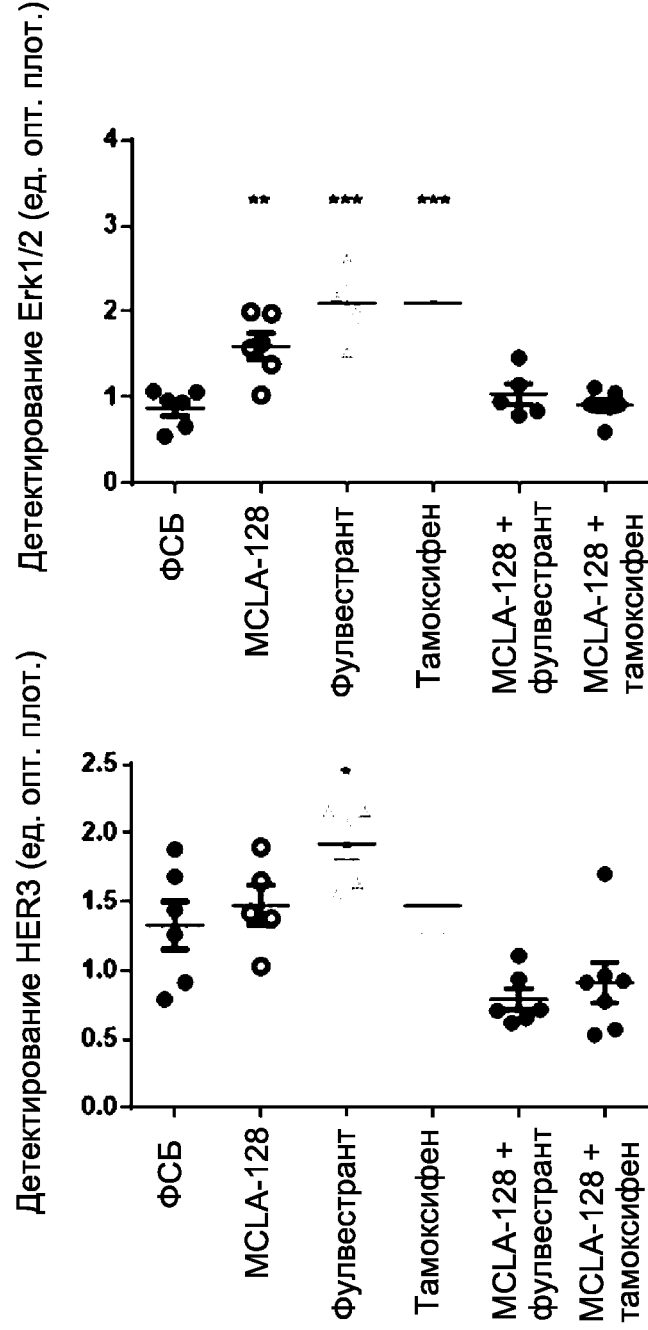
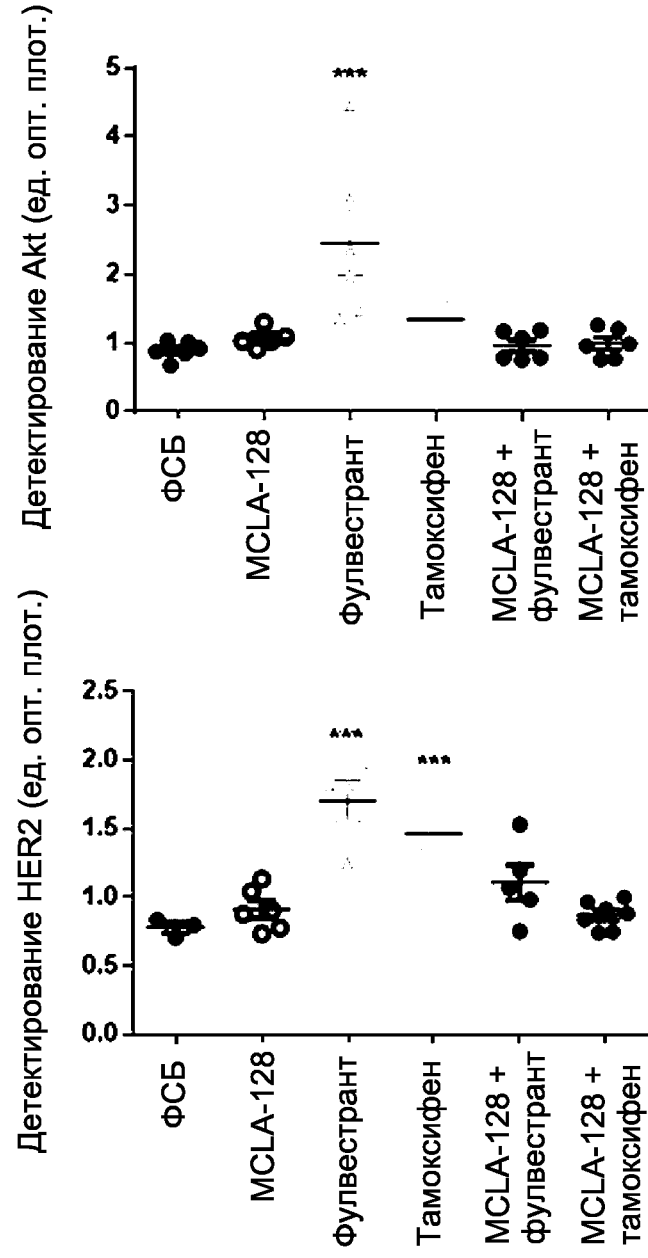
№ образца	H3T		KB%
	Февр. 2016	Апр. 2016	
Gr.7 An.1	9,77	9,38	3%
Gr.7 An.3	6,87	6,62	3%
Gr.8 An.5	6,51	6,89	4%
Gr.9 An.1	9,24	7,38	16%
Gr.9 An.3	14,54	14,49	0%
Gr.10 An.4	8,67	8,23	4%

№ образца	H23D		KB%
	Февр. 2016	Апр. 2016	
Gr.7 An.1	1,94	1,98	2%
Gr.7 An.3	1,45	1,68	10%
Gr.8 An.5	1,69	2,08	15%
Gr.9 An.1	3,09	3,18	2%
Gr.9 An.3	4,20	5,14	14%
Gr.10 An.4	1,62	1,85	10%

Фиг. 7

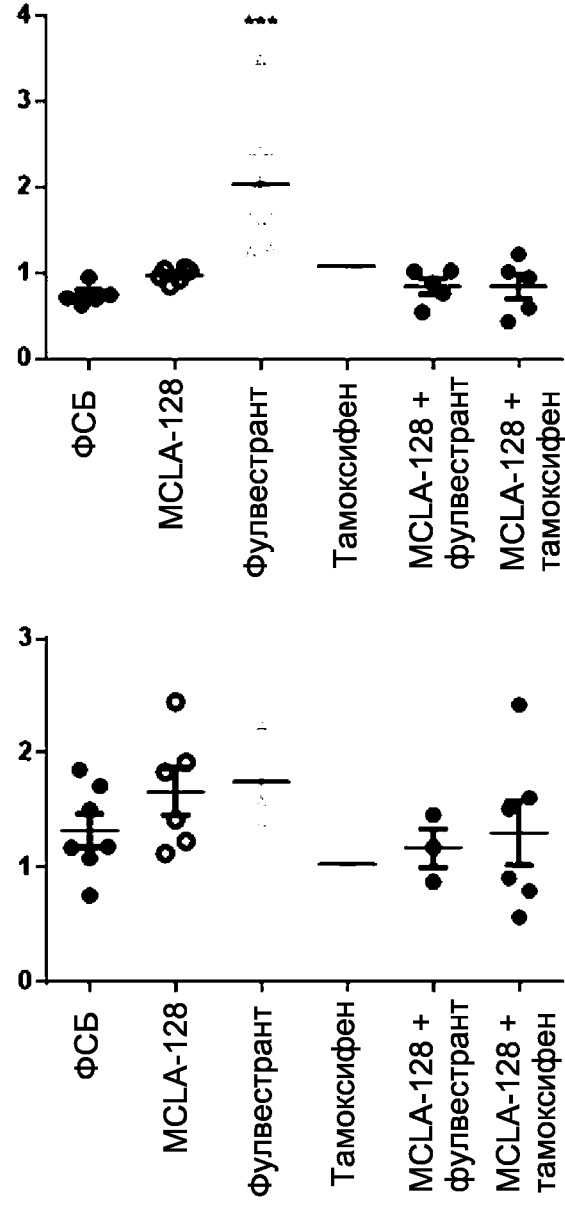


Фиг. 8

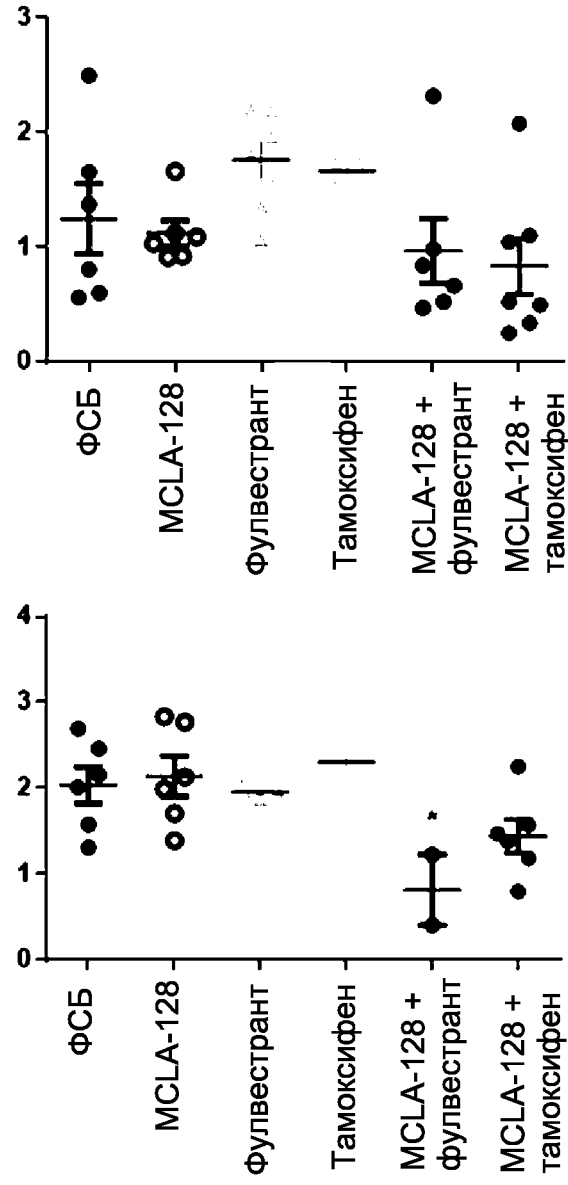


Фиг. 9

Детектирование p-HER2 (ед. опт. плот.) Детектирование p-Akt (ед. опт. плот.)



Детектирование p-HER3 (ед. опт. плот.) Детектирование p-Erk1/2 (ед. опт. плот.)



Фиг. 9,
Продолж.

Фиг. 10А

MF2926: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAACC
61  TGGGGCTTCA GTGATGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG GCTACCACAT
121 GAACTGGGTG AAGCAAAGTC CTGAAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGAGACA TAAATCCTAG
181 CATTGGTACG ACTGCCCACA ACCAGATTTT CAGGGCCAAG GCCACAATGA CTGTTGACAA
241 ATCCTCCAAC ACAGCCTACA TGCAGCTCAA GAGCCTGACA TCTGAAGACT CTGGAGTCTT
301 TTA CTGTGTT AGAAGAGGGG ACTGGTCCTT CGATGTCTGG GGCACAGGGA CCACGGTCAC
361 CGTCTCCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLQQSGPELVKPGASVMISCKASGYSFTGYHMNWVKQSPEKSLEWIGDINPSIGTTA
 HNQIFRAKATMTVDKSSNTAYMQLKSLTSEDSGVFYCVRRGDWSFDVWGTGTTVTVSS
 CDR1: GYHMNWVKQSPEKSLE
 CDR2: NQIFRA
 CDR3: RGDWSFDV

MF2930: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAAC TGGTGAAGCC
61  TGGAGCCTCA GTGATGATGT CCTGTAAGGT TTCTGGCTAC ACCTTCACTT CCTATCCTAT
121 AGCGTGGATG AAGCAGGTTT ATGGAAGAG 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

```

Аминокислотная последовательность:

EVQLQQSGAELVKPGASVMMSCCKVSGYTFTSYPIAWMKQVHKGKSLEWIGNFHPYSDDT
 KYNENFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLTSDDSAVYYCARSNPLYFFAMDYWGQGTSTV
 VSS
 CDR1: SYPIAWMKQVHKGKSLE
 CDR2: NENFKG
 CDR3: SNPLYFFAMDY

MF1849: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (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 AAAGGTGACT ACGGTTCTTA CTCTTCTTAC GCCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCAGT

```

Фиг. 10А, Продолж.

Аминокислотная последовательность:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYAFDYWGQGT
 LVTSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GDYGSYSSYAFDY

MF2973: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

1 GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
 61 TGGGGCTTCA GTGAAGTTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ATTTTCACTG GCTACTATAT
 121 AAAGTGGTTG AGGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAATGG ATTGCAAAAA TTTATCCTGG
 181 AAGTGGTAAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
 241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
 301 TTTCTGTGCA AGAGGGCCCC ACTATGATTA CGACGGCCCC TGGTTTGTTT ACTGGGGCCA
 361 AGGGA CTCTG GTCACCGTCT CCAGT

Аминокислотная последовательность:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTGYYINWLRQRPGQGLEWIAKIYPGSGNTYY
 NEKFRGKATLTAEESSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGPHYDYDGPWFVYWGQGT
 LVTSS

CDR1: GYYINWLRQRPGQGLE

CDR2: NEKFRG

CDR3: GPHYDYDGPWFVY

MF3004: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

1 GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
 61 TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACTG GCTACTATAT
 121 AAAGTGGGTG 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

Аминокислотная последовательность:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIAIRIYPGSGYTY
 YNEKFKGKATLTAEESSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGTGTTV
 TSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

Фиг. 10А, Продолж.

MF2971: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAACTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAGTG CCTACTATAT
121 AAAGTGGGTG 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

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGYTY
YNEIFKGRATLTAEDESSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQGLTVT
VSS

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEIFKG

CDR3: PPVYYDSAWFAY

MF3025: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGACTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAGTG GCTACTATAT
121 AAAGTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAAC ACTGCCTATA TGCACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGGCCCCACT ATGGTTACGA CGACTGGTAC TTCGCTGTCT GGGGCACAGG
361 GACCACGGTC ACCGTCTCCA GT

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLKQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTGYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGYTY
YNEKFKGKATLTAEESNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFAVWGTGTTV
TVSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFAV

MF2916: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAGTG GCTACTATAT
121 AAAGTGGGTG 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

```

Фиг. 10А, Продолж.

Аминокислотная последовательность:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGHTS
YNEKFKGKATLTTEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPIYFDYAGGYFDVWGTRTSVT
VSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PIYFDYAGGYFDV

MF3958: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

1 GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGCGCCGAAG TGAAGAAACC
61 TGGCGCCAGC GTGAAGCTGA GCTGCAAGGC CAGCGGCTAC ACCTTCACCG CCTACTACAT
121 CAACTGGGTC CGACAGGCCC CAGGCCAGGG CCTGGAATGG ATCGGCAGAA TCTACCCCGG
181 CTCCGGCTAC ACCAGCTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCAGA GCCACCTGA CCGCCGACGA
241 GAGCACCAGC ACCGCCTACA TGGAAGTGA CAGCCTGCGG AGCGAGGATA CCGCCGTGTA
301 CTTCTGCGCC AGACCCCCCG TGTACTACGA CAGCGCTTGG TTTGCCTACT GGGGCCAGGG
361 CACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGYTS
AQKFQGRATLTADDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQGTTLVT
VSS

CDR1: AYYIN

CDR2: RIYPGSGYTSYAQKFQG

CDR3: PPVYYDSAWFAY

MF3031: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

1 GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACTG CCTACTATAT
121 AAAGTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAAGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAATTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGT ACTGCCTACA TACAACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGCGTCT ATGATTACGA CGGGGCCTGG TTTGCTTACT GGGGCCAAGG
361 GACTCTGGTC ACCGTCTCCA GT

Аминокислотная последовательность:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIAKIYPGSGYTY
YNENFRGKATLTAEESSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARGVYDYDGAWFAYWGQGTTLVT
VSS

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NENFRG

CDR3: GVDYDGAWFAY

Фиг. 10А, Продолж.

MF3991: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG  GCCATGGCCC  AGGTGCAGCT  GGTGCAGTCT  GCGCCGAAG  TGAAGAAACC
61  TGGCGCCAGC  GTGAAGCTGA  GCTGCAAGGC  CAGCGGCTAC  ACCTTCACCG  CCTACTACAT
121  CAACTGGGTC  CGACAGGCCC  CAGGCCAGGG  CCTGGAATGG  ATCGGCAGAA  TCTACCCCGG
181  CTCCGGCTAC  ACCAGCTACG  CCCAGAAGTT  CCAGGGCAGA  GCCACCCTGA  CCGCCGACGA
241  GAGCACCAGC  ACCGCCTACA  TGGAAGTGA  CAGCCTGCGG  AGCGAGGATA  CCGCCGTGTA
301  CTTCTGCGCC  AGACCCCACT  ACGGCTACGA  CGACTGGTAC  TTCGGCGTGT  GGGGCCAGGG
361  CACCCTGGTC  ACCGTCTCCA  GT

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGYTS
YAQKFQGRATLTADSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGQGTLV
TVSS

CDR1: AYYIN

CDR2: RIYPGSGYTSYAQKFQG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

Фиг. 10B

MF3178: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAATATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGG
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYWG
 QGTLVTVSS

CDR1: GYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

MF3176: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GTTGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTACAGCC
61 TGGGGGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACCTTTAGCA GCTATGCCAT
121 GAGCTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGGAAGGG GCTGGAGTGG GTCTCAGCTA TTAGTGGTAG
181 TGGTGGTAGC ACATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGCCCG TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCCGAGGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATTGGT GGTACCCGCC GTACTACTGG GGCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWWYPPYYWGFDYWGQGLT
 VTVSS

CDR1: SYAMS

CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG

CDR3: DWWYPPYYWGFDY

MF3163: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAATATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
301 TTA CTGTGCA AAAGATTCTT ACTCTCGTCA TTTCTACTCT TGGTGGGCCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```


Фиг. 10В, Продолж.

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGG
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAKDSYSRHFYSWWAFDYWG
 QGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DYSRHFYSWWAFDY

MF3099: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (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 GCCACATTAA CAGTAGACAC
 241 ATCCTCCAGC ATAGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGCTCTA
 301 TTA CTGTGCA AGAGGGGGAG ATTACGACGA GGGAGGTGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
 361 AACCTCGGTC ACCGTCTCCA GT

Аминокислотная последовательность:

EVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGILDPSDSYTT
 YNQKFKGKATLTVDTSSSIAYMQLSSLTSEDSALYYCARGGDYDEGGAMDYWGQGTSVT
 VSS

CDR1: SYWMH

CDR2: ILDPDSYTTYNQKFKG

CDR3: GGDYDEGGAMDY

MF3307: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

1 GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
 61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
 121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
 181 CAGTGGTGGC ACAAACCTATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
 241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
 301 TTA CTGTGCA AGAGGTTCTC GTAAACGTCT GTCTAACTAC TTCAACGCCT TTGATTATTG
 361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGG
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGSRKRLSNYFNAFDYWGQ
 GTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: GSRKRLSNYFNAFDY

Фиг. 10C

а) Общая легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 10D

тяжелая цепь для связывания erbB-2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPSGYS
 YAQKFQGRATLTADSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQGTLLV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTD
 PSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

тяжелая цепь для связывания erbB-3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGG
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYWG
 QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 10Е

HER2-специфичные последовательности антител

MF2889: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (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 АСТATCTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCAACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CGGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGAGACT ATGATTACAA ATATGCTATG GACTACTGGG GTCAAGGAAC
361 CTCGGTCACC GTCTCCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

EVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPQGQLEWIGVIYPEGGGTIY
NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARGDYDYKYAMDYWGQGTSVTV
SS

CDR1: NYLIE

CDR2: VIYPEGGGTIYNEKFKG

CDR3: GDYDYKYAMDY

MF2913: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCAAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61  TGGCGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG ACTACAAAAT
121 GGA CTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTCGAATGG ATTGGAAATA TTAATCCTAA
181 CAGTGGTGGT GTTATCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG GTCACATTGA CTGTTGACAG
241 GTCCTCCAGC GCAGCCTACA TGGAGCTCCG CAGCCTGACA TCTGAGGACA CTGCAGTCTA
301 TTATTGTTCA AGAGGACTGT GGGATGCTAT GGA CTCTCTGG GTCAAGGAA CCTCGGTCAC
361 CGTCTCCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYKMDWVKQSHGKSLEWIGNINPNSSGGVI
YNQKFRGKVTLTVDRSSSAAYMELRSLTSEDТАVYYCSRGLWDAMDSWGQGTSVTVSS

CDR1: DYKMDWVKQSHGKSLE

CDR2: NQKFRG

CDR3: GLWDAMDS

Фиг. 10Е, Продолж.

MF1847: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTG 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

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWWHPLL SGFDYWGQGTL
VTVSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GWWHPLL SGFDY

MF3001: последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (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 TAACTGGGTT TACTTACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC
361 CGTCTCCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

EVQLQQSGAELAKPGASVKLSCKTSGYNFPIYWMHWVKQRPGRGLEWIGYINPSTGYIK
NNQKF~~KD~~KATLTADKSSNTAYMQLNSLTYEDSAVYYCTREGITGFTYWGQGTLVTVSS

CDR1: IYWMHWVKQRPGRGLE

CDR2: NQKF~~KD~~

CDR3: EGITGFTY

Фиг. 10Е, Продолж.

MF1898: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (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 CCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD GFRRTT LSGFDYWGQGL
TVSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: D GFRRTT LSGFDY

MF3003: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-2

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGCGAC GCATTCAGTT ACTCCTGGAT
121 GAACTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGAAAGGG TCTTGAGTGG ATTGGACGGA TTTATCCTGG
181 AGATGGAGAT ATTA ACTACA ATGGGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACAGCCACAC TGCAACTCAA CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 CTTCTGTGCA AGAGGACAGC TCGGACTAGA GGCCTGGTTT GCTTATTGGG GCCAGGGGAC
361 TCTGGTCACC GTCTCCAGT

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGDAFSYSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDGDI
NYNGKFKGKATLTADKSSSTAHLQLNSLTSEDSAVYFCARGQLGLEAWFAYWGQGLTV
TVSS

CDR1: YSWMNWVKQRPGKGLE

CDR2: NGKFKG

CDR3: GQLGLEAWFAY

Фиг. 10Е, Продолж.

HER3-специфичные последовательности антител

MF6058: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGACG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCA CGTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGC TCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 AAGTGGTGGC ACAAACATATG CAAAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCTCTATGA CCAGGGAGAC
241 GTCCACAAGC ACAGCCTACA TGCAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTACGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGADVKKPGASVKVTCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQALEWMGWINPQSGG
 TNYAKKFQGRVSMTRSTSTAYMQLSRLRSDDTATYYCARDHGSRHFWSYWGFDYW
 GQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPQSGGTNYAKKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

MF6061: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 GAGTGGTGGC ACAAACATATG CACAGAAGTT TAAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCACCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPQSGG
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYW
 GQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPQSGGTNYAQKFKG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

Фиг. 10Е, Продолж.

MF6065: последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела, связывающего erbB-3

Последовательность нуклеиновой кислоты (подчеркнутая последовательность кодирует конец лидерного пептида):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCT CTTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 GGGGGGTTCT ACAAACATAT CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCACCAGC ACAGTGTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCTGTGTA
301 TTA CTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPQGGS
 TNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSED TAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYW
 GQGTLVTVSS

CDR1: SYMH

CDR2: WINPQGGSTNYAQKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

Фиг. 11

Выравнивание аминокислотных последовательностей вариантов MF3178

Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3178 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

	CDR1										CDR2									
	1	10	20	30	40	50	60													
MF3178	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	<u>GYMH</u>	WVRQAPGQGLEWMG	<u>WINPNSGGTNYAQKFOG</u>																
MF6055	D.....	A.....	S.....K.....																	
MF6056	D.....T.....	A.....	S.....K.....																	
MF6057	D.....T.....	Q.....																		
MF6058	D.....T.....	A.....	Q.....K.....																	
MF6059	D.....	G.....S.....																		
MF6060	D.....	A.....	Q.....K.....																	
MF6061		Q.....K.....																		
MF6062		G.....S.....																		
MF6063		Q.....K.....																		
MF6064		K.....	Q.....																	
MF6065	S.....	QG.....S.....																		
MF6066		Q.....S.....																		
MF6067		Q.....																		
MF6068		Q.....																		
MF6069		Q.....																		
MF6070	S.....	SG.....S.....																		
MF6071		S.....S.....																		
MF6072		S.....																		
MF6073		S.....																		
MF6074		S.....																		

	CDR3									
	70	80	90	100	110	120				
MF3178	RVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR	<u>DHGSRRHFWSYWGFDY</u>	WGQGTILTVSS							
MF6055	E..T.....T.....									
MF6056	..S...E..T....Q.....T.....									
MF6057	Q.....									
MF6058	..S...E..T....Q.....T.....									
MF6059										
MF6060	E..T.....T.....									
MF6061	T.....									
MF6062	T.....									
MF6063	T.....									
MF6064	T.....									
MF6065	T..V.....E.....									
MF6066	T.....S...E.....									
MF6067	T..V.....S.....									
MF6068	T.....									
MF6069										
MF6070	T..V.....E.....									
MF6071	T.....S...E.....									
MF6072	T..V.....S.....									
MF6073	T.....									
MF6074										

Фиг. 11, Продолж.

Выравнивание нуклеиновой кислоты вариантов MF3178 (без конца лидерной последовательности)

```
MF3178 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
MF6058 .....C.....A.G.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

CDR1

```
MF3178 GCTTCTGGATACACCTTCACC GGCTACTATATGCAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
MF6058 .....CT....
MF6061 .....
MF6065 .....TCT.....
```

CDR2

```
MF3178 AGTGGATGGGA TGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGT
MF6058 .....C.A.....A.....
MF6061 .....C.G.....A.....
MF6065 .....C.GG.G...TCT.....
```

```
MF3178 CACGATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
MF6058 .T.T.....G.....CA.....C.....
MF6061 .....C.....
MF6065 .....C.....TG.....G.....
```

CDR3

```
MF3178 GGCTGTGTATTACTGTGCAAGA GATCATGGTTCTCGTCATTTCTGGTCTTACTGGGGCTTTGATTAT
MF6058 ....AC.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

```
MF3178 TGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCCAGT
MF6058 .....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

Последовательности ДНК вариантов MF3178**MF6055**

>MF6055_VH

```
caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgactgggtgacagggcccctggacaagctcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcacc
```

Фиг. 11, Продолж.

MF6056

>MF6056_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtcacgtgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagctcttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtctctatg
 accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6057

>MF6057_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgatgtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtcacgtgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccatcagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6058

>MF6058_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtcacgtgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagctcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcaaagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtctctatg
 accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6059

>MF6059_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6060

>MF6060_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagctcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcaaagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6061

>MF6061_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttaagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

Фиг. 11, Продолж.

MF6062

>MF6062_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

MF6063

>MF6063_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

MF6064

>MF6064_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggaaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccacgagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

MF6065

>MF6065_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcacctcttactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcaggggggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagtgtacatggagctgagcaggctgagatctgaggacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

MF6066

>MF6066_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgaggacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

Фиг. 11, Продолж.

MF6067

>MF6067_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagctctacatggagctgagctctctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6068

>MF6068_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6069

>MF6069_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6070

>MF6070_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcacccttactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctgggggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagctgtacatggagctgagcaggctgagatctgaggacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

MF6071

>MF6071_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgaggacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
 taccctggtcacc

Фиг. 11, Продолж.

MF6072

>MF6072_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagctctacatggagctgagctctctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

MF6073

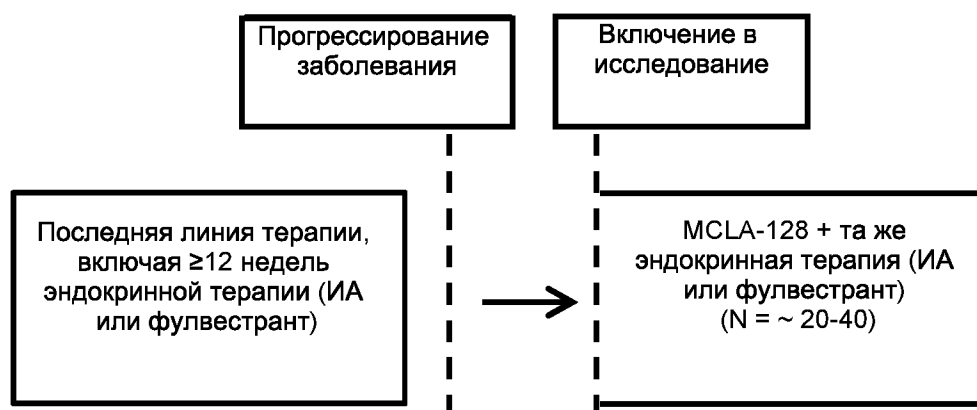
>MF6073_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcacc

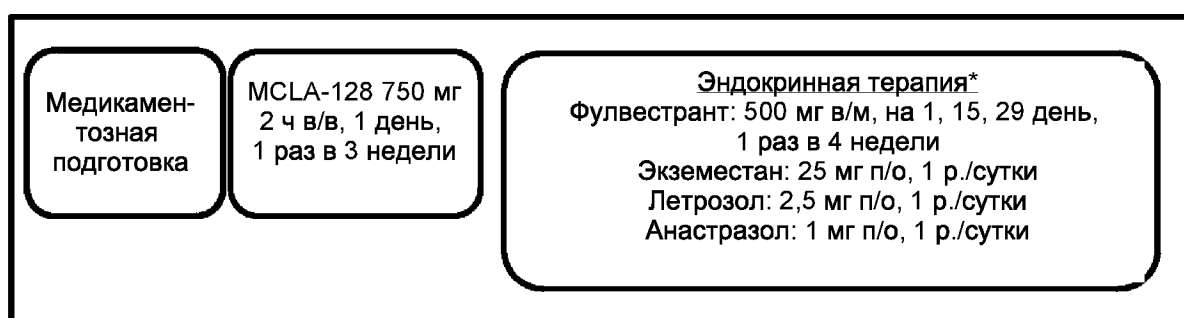
MF6074

>MF6074_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcacc



Фиг. 12



Фиг. 13