

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090215** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.09

(54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ EGFR И cMET

(31) 17185572.9

(32) 2017.08.09

(33) EP

(86) PCT/NL2018/050537

(87) WO 2019/031965 2019.02.14

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Гёин Сесилия Анна Вильгельмина,
Роверс Робертус Корнелис, Тросби
Марк, Де Крёйф Корнелис Адриан,
Логтенберг Тон (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, относится к биспецифичным антителам, содержащим первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста EGFR, и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой протоонкогеном MET (cMET). Антитело может содержать общую легкую цепь. Антитело может представлять собой антитело человека. Антитело может представлять собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации биспецифичное антитело представляет собой антитело формата IgG1, имеющее стехиометрию анти-EGFR, анти-cMET 1:1. В некоторых вариантах реализации антитело имеет один вариабельный домен, который может связывать EGFR, и один вариабельный домен, который может связывать cMET.

A1

202090215

202090215

A1

АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ EGFR И cMET

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, настоящее изобретение относится к области терапевтических антител, в том числе антител человека, для лечения заболеваний, связанных с аберрантными клетками. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, связывающим EGFR и cMET, в том числе к мультиспецифичные антитела, и их применению в связывании EGFR и cMET-положительных клеток, в частности опухолевых клеток.

Рецептор EGFR эпидермального фактора роста (EGF) является рецептором клеточной поверхности для членов семейства эпидермальных факторов роста (семейство EGF), относящихся к внеклеточным белковым лигандам. EGFR также известен как рецептор ErbB-1. В прошлом рецептору давали различные названия (EGFR; ERBB; ERBB1; HER1; PIG61; mENA). В настоящем изобретении названия ErbB-1, EGFR или HER1 у человека будут применяться взаимозаменяемо. EGFR является членом семейства рецепторов ErbB, подсемейства из четырех близко связанных рецепторных тирозинкиназ: ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER2/c-neu; Her2), ErbB-3 (Her 3) и ErbB-4 (Her 4).

EGFR существует на поверхности клетки и может быть активирован связыванием его специфичных лигандов, включая эпидермальный фактор роста и трансформирующий фактор роста α (TGF α). При активации лигандами фактора роста рецептор может претерпевать переход от неактивной преимущественно мономерной формы к активному гомодимеру. В дополнение к образованию гомодимеров после связывания лиганда, EGFR может спариваться с другим членом семейства рецепторов ErbB, таким как ErbB2, для создания активированного гетеродимера. Димеры могут также образовываться в отсутствие связывания лиганда, и после связывания лиганда могут образовываться кластеры активированных EGFR.

Димеризация EGFR стимулирует активность собственных внутриклеточных протеин-тирозин-киназ (РТК). Данная активность индуцирует несколько каскадов трансдукции (передачи) сигналов, которые приводят к пролиферации и дифференцировке клеток. Киназный домен EGFR может перекрестно фосфорилировать тирозиновые остатки других рецепторов, с которыми он связан, и сам может быть активирован таким образом.

Мутации, затрагивающие EGFR, были идентифицированы в нескольких типах рака. Данные мутации представляют собой мишень для расширяющегося класса противораковых терапевтических средств. Такие терапевтические средства включают ингибиторы тирозинкиназы EGFR (EGFR-TKIs), такие как гефитиниб и эрлотиниб при раке легких, и антитела, такие как цетуксимаб и панитумумаб при раке толстой кишки и раке головы и шеи.

Цетуксимаб и панитумумаб представляют собой моноклональные антитела, которые ингибируют данный рецептор. Другие моноклональные антитела, которые

находятся на стадии клинических исследований, представляют собой залутумумаб, нимотузумаб и матузумаб. Моноклональные антитела направлены на блокирование внеклеточной лиганд-индуцированной активации рецептора, главным образом путем блокирования связывания лиганда с рецептором. В случае, если сайт

5 связывания заблокирован, индуцирующие сигнал молекулы могут присоединяться неэффективно и тем самым также не активировать нисходящие сигналы. Лиганд-индуцированная активация рецептора может также ингибироваться стабилизацией неактивной конформации рецептора (матузумаб).

На сегодняшний день направленные на EGFR терапевтические средства

10 связаны с развитием резистентности к лечению с течением времени. Были описаны различные механизмы резистентности к EGFR-TKIs. У пациентов с прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) механизмы резистентности включают возникновение вторичных мутаций (например, T790M, C797S), активацию альтернативной передачи сигнала (например, Met, фактор роста

15 гепатоцитов, HGF, AXL, Hh, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R)), aberrантные нисходящие пути (например, мутации AKT, потеря PTEN), нарушение EGFR-TKIs-опосредованного пути апоптоза (например, bcl2-подобный 11/BIM делеционный полиморфизм) и гистологическую трансформацию. Хотя некоторые механизмы резистентности были выявлены, другие еще предстоит выявить.

20 Аналогичным образом, у пациентов с колоректальным раком, получающих лечение антителами против EGFR, со временем развивается резистентность. Это может происходить за счет появления мутаций KRAS. Без учета мутаций KRAS; амплификация прото-онкогена MET может быть связана с приобретенной резистентностью в процессе анти-EGFR терапии (Bardelli et al., 2013; Cancer Discov.

25 Jun;3(6):658-73. doi: 10.1158 / 2159-8290.CD-12-0558). Опухоль может быть резистентной с самого начала или развивать резистентность во время лечения. Резистентность к направленной на EGFR терапии наблюдается во многих EGFR-положительных раковых опухолях, и данная резистентность доказывает необходимость в более эффективных способах лечения рака, связанного с EGFR,

30 которые улучшают стандарты лечения и превосходят их по способности преодолевать резистентность к направленной на EGFR терапии.

Сообщали о нарушении регуляции Прото-онкогена MET, кодирующего

35 Рецепторную Тирозинкиназу (сMET) и фактора роста гепатоцитов HGF во множестве опухолей. Лиганд-управляемую активацию сMET наблюдали в нескольких видах рака. Повышенный уровень сывороточного и внутриопухолевого HGF наблюдают при раке легких, молочной железы и множественной миеломе (J. M. Siegfried et al., Ann Thorac Surg 66, 1915 (1998); P. C. Ma et al., Anticancer Res 23, 49 (2003); B. E. Elliott et al. Can J Physiol Pharmacol 80, 91 (2002); C. Seidel, et al, Med

40 Oncol 15, 145 (1998)). Гиперэкспрессия сMET, амплификация или мутация сMET были зарегистрированы при различных видах рака, таких как колоректальный, рак легких, желудка и почек, что может приводить к активации лиганд-независимых рецепторов (C. Birchmeier et al, Nat Rev Mol Cell Biol 4, 915 (2003); G. Maulik et al., Cytokine Growth Factor Rev 13, 41 (2002)). Экспрессия HGF также связана с

45 активацией сигнального пути HGF/сMET и также является одним из механизмов

«ускользания» опухолей под давлением отбора путем направленной на EGFR терапии.

5 Рецептор cMET образуется путем протеолитического процессинга общего предшественника в однократно проходящий через мембрану (однопроходный) дисульфид-связанный α/β гетеродимер. Внеклеточная часть cMET состоит из доменов трех типов. Складка N-концевого участка образует большой домен семафорина (Sema), который охватывает всю α -субъединицу и часть β -субъединицы. Домен плексин–семафорин–интегрин (PSI) следует за доменом Sema и содержит четыре дисульфидные связи. Этот домен связан с трансмембранной спиралью через 10 четыре домена иммуноглобулин-плексин-транскрипционного фактора (IPT), которые связаны с иммуноглобулиноподобными доменами. Внутриклеточная часть рецептора cMET содержит каталитический домен тирозинкиназы, фланкированный характерными юкстамембранными и карбокси-концевыми последовательностями (Organ and Tsao. Therapeutic advances in medical oncology 3.1_suppl (2011): S7-S19, 15 который включен в данную заявку в полном объеме путем ссылки).

Лиганд cMET, фактор роста гепатоцитов (HGF; также известный как рассеивающий фактор) и его сплайс изоформы (NK1, NK2) являются известными 20 лигандами рецептора cMET. HGF был идентифицирован в 1991 году как мощный митоген/морфоген. Сигнальный путь HGF/cMET играет важную роль в развитии и прогрессировании различных видов рака. Дисрегуляция и/или гиперактивация HGF или cMET при раке человека связаны с плохим прогнозом. cMET может быть активирован посредством гиперэкспрессии, амплификации или мутации. Активация может способствовать развитию, прогрессированию, инвазивному росту и 25 метастазированию рака. cMET может быть активирован как независимым, так и зависимым от HGF образом. Независимая от HGF активация происходит в случаях гиперэкспрессии cMET. Избыток cMET также может запустить (гетеро)димеризацию и внутриклеточную сигнализацию в отсутствие лиганда. Дополнительный лиганд, по-видимому, не влияет на функцию таких клеток с гиперэкспрессией cMET. 30 Амплификация cMET связана с гиперэкспрессией cMET и стала выступать в качестве биомаркера опухолевых подтипов.

HGF экспрессируется повсеместно по всему организму, показывая, что этот фактор роста является системно доступным цитокином, а также поступает из стромы 35 опухоли. Положительная паракринная и/или аутокринная петля активации cMET может привести к дальнейшей экспрессии cMET. HGF-специфичное антитело Рилотумумаб (AMG102) было разработано для лечения рака желудка. Первая и вторая стадии клинических испытаний казались многообещающими, но третья фаза испытаний с цисплатином и капецитабином в качестве терапии первой линии при 40 раке желудка (RILOMET-2) была прекращена после запланированного комитетом по мониторингу данных обзора безопасности исследования 20070622.

Значимость сигнализации cMET/HGF при резистентности к направленной на EGFR терапии стимулировала разработку способов борьбы с резистентностью. На 45 сегодняшний день подходы, основанные на антителах, которые включают антитела против HGF; антитела против cMET или cMET и cMET/EGFR (обзор в Lee et al.,

2015; Immunotargets and Therapy 4: 35-44) не были клинически эффективными. Антитела к cMET, Онартузумаб (MetMab™) и Эмибетузумаб (LY-2875358), были оценены во второй фазе клинических испытаний. Среди них Онартузумаб оказался эффективным против колоректального рака при комбинированном лечении вместе с ингибитором EGFR эрлотинибом. Эти результаты, однако, не могут быть повторены в третьей фазе рандомизированного клинического испытания. MetMab представляет собой моновалентное моноклональное антитело против cMET (мАТ), которое блокирует связывание HGF с cMET и последующую активацию пути (Jin et al., 2008 Cancer Research Vol. 68: pp 4360-68).

Преодолевая проблему с анти-EGFR, cMET и HGF иммунотерапией, настоящее изобретение обеспечивает новые биспецифичные антитела, которые содержат первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста EGFR, и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой прото-онкогеном MET (сMET).

На сегодняшний день в данной области техники описаны некоторые биспецифичные антитела к EGFR x cMET. Castoldi R. и др. (2013) описывают биспецифичное антитело к EGFR x cMET, обозначенное MetHer1, с сайтом связывания cMET из антитела 5D5 (или MetMab) и сайтом связывания EGFR из цетуксимаба. Биспецифичное антитело имеет фиксированную стехиометрию связывания EGFR и cMET 2:1 (см. Дополнительные Фигуры)

Заявка на патент США 20140378664 описывает биспецифичное антитело cMET x EGFR среди различных других биспецифичных антител. Полноразмерное биспецифичное антитело продуцируется в виде одного белка, который затем протеолитически расщепляется. Два домена VH/VL продуцируются как одноцепочечные фрагменты Fv. Связывание антитела индуцирует деградацию cMET и фосфорилирование Akt в клеточной линии рака желудка. Moores и др. (2016) описывают биспецифичное антитело к cMET x EGFR, обозначенное JNJ-61186372, полученное при помощи контролируемого обмена Fab-фрагментов (сFAE), имеющее мутации в положениях 405 и 409 согласно нумерации EU, которые могут иметь потенциал для иммуногенности. Было показано, что JNJ-61186372 активно *in vivo* с использованием модели ксенотрансплантата с опухолевой клеточной линией H1975, экспрессирующей лиганд cMET HGF. Известно, что данная модель опухоли зависит от активности антитела по индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности, АЗКЦ (ADCC) (Ahmed et al., 2015). Сообщалось, что JNJ-61186372 имеет дисбаланс аффинности, приблизительно в 40 раз большую аффинность к cMET, чем к EGFR (Moores et al. (2016)), и анти-EGFR плечо, полученное из залутумаба, как известно, вызывает, помимо других проблем, реакцию, связанную с инфузионным введением, и поражения кожи.

LY3164530 представляет собой биспецифичное антитело к cMET x EGFR, которое содержит EGFR-связывающий домен цетуксимаба в виде одноцепочечного фрагмента Fv, слитого с вариабельным доменом тяжелой цепи cMET-связывающего антитела LY2875358 (Emibetuzumab; Kim and Kim 2017). Данное антитело

представляет собой так называемое антитело с двойными переменными доменами, которое содержит два сайта связывания для каждого из антигенов. Данные об ингибировании HGF антителом не приводятся. Сообщают, что антитело связывает и интернализует cMET и EGFR без агонистической активности. Авторы рассматривают различные терапевтические средства, направленные на cMET, EGFR и MET x EGFR и делают вывод, согласно которому на сегодняшний день ни один из указанных ингибиторов не показал значительной эффективности в клинических испытаниях.

Таким образом, существует потребность в новых биспецифичных антителах к cMET x EGFR, в том числе таких, которые могут иметь улучшенные характеристики, согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего изобретения предложено биспецифичное антитело, которое содержит первый переменный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR), и второй переменный домен, который может связывать внеклеточную часть рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой прото-онкогеном MET (MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase) (cMET).

Биспецифичное антитело может содержать общую легкую цепь. Первый и второй переменные домены предпочтительно содержат одну и ту же или, по существу, одну и ту же (общую) переменную область легкой цепи. Указанная общая переменную область легкой цепи может быть той, которая, как известно, хорошо сочетается с разнообразием генных сегментов переменной области иммуноглобулина человека, которые подверглись рекомбинации. Более предпочтительно указанная общая легкая цепь предпочтительно представляет собой переменную область, кодируемую сегментом гена V_k зародышевой линии, предпочтительно сегментом гена переменной области O12 / IgV_k1-39 * 01. Предпочтительно, переменная область легкой цепи содержит реаранжированную IgV_k1-39*01/IGJk1*01 или IgV_k1-39*01/IGJk5*01. Легкая цепь связывающего cMET плеча и легкая цепь связывающего EGFR плеча предпочтительно являются одной и той же (общей) легкой цепью. Общая легкая цепь предпочтительно представляет собой реаранжированную легкую цепь Каппа IgV_k1-39*01/IGJk1*01 или IgV_k1-39*01/IGJk5 * 01 присоединенную к константной области легкой цепи человека. Биспецифичное антитело может представлять собой антитело человека.

Биспецифичное антитело может представлять собой полноразмерное антитело.

Данное антитело может иметь один переменный домен, который может связывать EGFR и один переменный домен, который может связывать cMET. В одном аспекте переменный домен, который может связывать EGFR человека, может также успешно связывать EGFR мыши и/или EGFR яванского макака.

Переменный домен, который может связывать EGFR человека, может связывать домен III EGFR человека. Переменный домен, который может связывать cMET, может блокировать связывание антитела 5D5 с cMET. Переменный домен,

который может связывать сMET, может блокировать связывание HGF с сMET. Константа диссоциации Kd антитела для сMET может быть по крайней мере в 10 раз меньше, чем Kd антитела для EGFR. Аминокислоты в положениях 405 и 409 в одном домене CH3 могут быть такими же, как аминокислоты в соответствующих положениях в другом домене CH3 (EU-нумерация).

Первый переменный домен может содержать переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYX₁X₂NTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность X₃X₄X₅X₆HWLX₇A

где X₁ = N или S; X₂ = A или G; X₃ = D или G; X₄ = R, S или Y; X₅ = H, L или Y; X₆ = D или W и X₇ = D или G; с 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией в положении, отличном от X₁-X₇.

Второй переменный домен может содержать переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-23 с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

Описаны биспецифичные антитела, в которых

X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;

X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;

X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;

X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;

X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;

X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;

X₁ = N; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G;

X₁ = N; X₂ = A; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G; или

X₁ = S; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G. В некоторых вариантах

реализации

X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;

X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D; или

X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D.

В предпочтительном варианте реализации X₃-X₇ = DRHWD и X₁ и X₂ представляют собой NG; SG или NA.

Описаны биспецифичные антитела, в которых переменный участок тяжелой цепи второго переменного домена содержит аминокислотную последовательность одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-3; 7; 8; 10; 13; 15; 16; 17; 21; 22 или 23 с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения субъекта, у которого есть опухоль, включающий введение биспецифичного антитела, как описано в настоящей заявке, индивидууму, нуждающемуся в нем. Как правило,

индивидуум страдает от заболевания, включающего аберрантные клетки, например, индивидуум может страдать от опухоли.

В настоящем изобретении также предложено биспецифичное антитело, которое содержит первый переменный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста EGFR и второй переменный домен, который может связывать внеклеточную часть рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой прото-онкогеном MET (сMET), причем первый переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYX₁X₂NTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность X₃X₄X₅X₆HWLX₇A, в которой

X₁ = N или S; X₂ = A или G; X₃ = D или G; X₄ = R, S или Y; X₅ = H, L или Y; X₆ = D или W и X₇ = D или G с 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией в положении, отличном от X₁-X₇, и где второй переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-23 с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией.

Первый переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDAFDY, и второй переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQQFTG и CDR3, который содержит последовательность ETTYDRGGYPFDP.

В настоящем изобретении также предложено биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, для применения в лечении субъекта, у которого есть заболевание, включающее аберрантные клетки, такое как опухоль.

Также предложено применение биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, включающего аберрантные клетки, такого как опухоль или рак.

Также предложен способ лечения субъекта, у которого присутствует опухоль, предпочтительно EGFR-положительная опухоль, сMET-положительная опухоль или EGFR и сMET-положительная опухоль, включающий введение биспецифичного антитела индивидууму, нуждающемуся в нем.

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно ингибирует индуцированную HGF миграцию клеток EBC1 в анализе заживления ран. Предпочтительно ингибирование сильнее, чем

комбинация цетуксимаба и MetMab. Например, предпочтительно достичь ингибирования путем предотвращения закрытия раны в присутствии HGF с EGF или без него (HGF присутствует в концентрации 15 нг/мл, а EGF, когда присутствует, присутствует в количестве 12,5 нг/мл).

5

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует HGF и EGF/HGF индуцированный рост резистентных к EGFR TKI опухолевых клеточных линий PC-9 и HCC827 при применении в комбинации с TKI. TKI предпочтительно представляет собой гефитиниб.

10

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует индуцированный HGF рост HGF-чувствительной клетки, предпочтительно линии EGFR TKI резистентных опухолевых клеток PC-9 или HCC827.

15

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует EGF-индуцированный рост EGF-чувствительной клетки, не индуцируя эффектов токсичности, таких как сыпь и диарея, связанных с высокоаффинными двухвалентными антителами к EGFR. Это делает антитело идеально подходящим для применения в комбинации с TKI, которые имеют свой собственный профиль токсичности.

20

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичное антитело, раскрытое в настоящей заявке.

25

Антитело согласно настоящему изобретению может быть применено для лечения опухоли, резистентной к лечению ингибитором тирозинкиназы EGFR, например резистентной к эрлотинибу, гефитинибу или афатинибу, аналогу эрлотиниба, гефитиниба или афатиниба или комбинации одного или нескольких соответствующих соединений и/или их аналогов.

30

Лечение, согласно настоящему изобретению, может также включать лечение ингибитором тирозинкиназы EGFR, где, например, ингибитором тирозинкиназы EGFR является эрлотиниб.

35

Соответственно, биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению можно вводить одновременно, последовательно или отдельно с ингибитором тирозинкиназы EGFR.

40

Настоящее изобретение также включает молекулу нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновой кислоты, которые по отдельности или совместно кодируют тяжелую цепь (цепи) или переменную область (области) тяжелой цепи биспецифичного антитела, раскрытого в настоящей заявке, или его варианта. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты или группа молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело, раскрытое в настоящей заявке.

45

В предпочтительном варианте реализации тяжелая цепь содержит константную область антитела иммуноглобулина G, IgG1, предпочтительно антитела класса IgG1 человека. Область CH2 указанной константной области IgG1 может быть сконструирована для изменения активности АЗКЦ (ADCC) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности, КЗЦ (CDC) антитела, или нет. В предпочтительном варианте реализации указанное изменение приводит к повышению активности АЗКЦ (ADCC) и/или КЗЦ (CDC). В предпочтительном варианте реализации CH3-область антитела сконструирована для облегчения гетеродимеризации тяжелых цепей, содержащих первую тяжелую цепь, которая связывает EGFR, и вторую тяжелую цепь, которая связывает cMET.

Настоящее изобретение также включает клетку, содержащую одну или более молекул нуклеиновых кислот, которые по отдельности или совместно кодируют биспецифичное антитело или его вариант, согласно настоящей заявке. Также предложены способы получения биспецифичного антитела или его варианта, раскрытого в настоящей заявке, с использованием клетки, раскрытой в настоящей заявке, предпочтительно вместе с получением биспецифичного антитела или его варианта из культуры клеток.

Настоящее изобретение также включает клеточную систему, содержащую биспецифичное антитело или его вариант, раскрытый в настоящей заявке.

В настоящем изобретении также предложена клетка, которая экспрессирует биспецифичное антитело и/или содержит молекулу(молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующую указанное биспецифичное антитело.

Настоящее изобретение также включает биспецифичное антитело, согласно настоящей заявке, которое также содержит метку, предпочтительно метку для визуализации *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

EGFR является членом семейства из четырех рецепторных тирозинкиназ (RTKs), называемых Her - или cErbB-1, -2, -3 и -4. EGFR имеет внеклеточный домен (ECD), состоящий из четырех субдоменов, два из которых участвуют в связывании лигандов, а один - в гомо-димеризации и гетеро-димеризации Ferguson (2008). Номера ссылок, используемые в этом разделе, относятся к нумерации ссылок в перечне, озаглавленном «цитируется в описании», каждая из которых включена путем ссылки. EGFR интегрирует внеклеточные сигналы от различных лигандов для обеспечения различных внутриклеточных ответов (Yarden et al. 2001; и Jorissen et al. 2003). EGFR вовлечен в несколько видов злокачественных новообразований эпителия человека, в частности, рак молочной железы, мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легких, толстой кишки, яичников, шеи и головного мозга. Были обнаружены активирующие мутации в гене, а также гиперэкспрессия рецептора и его лигандов, приводящая к возникновению аутокринных петель активации (обзор см. Robertson et al. 2000). Поэтому RTK широко применяется в

качестве мишени для противораковой терапии. Были разработаны как низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на RTK, так и моноклональные антитела (мАБ), направленные на внеклеточные лиганд-связывающие домены, и ранее они продемонстрировали некоторые клинические успехи, хотя и в основном для избранной группы пациентов. Номера доступа в базе данных для белка EGFR человека и гена, кодирующего его (GenBank NM_005228.3). Другими идентификаторами базы данных для гена и/или белка являются HGNC: 3236; Entrez Gene: 1956; Ensembl: ENSG00000146648; OMIM: 131550 и UniProtKB: P00533. Номера доступа в первую очередь даны для обеспечения дальнейшего способа идентификации белка EGFR в качестве мишени, фактическая последовательность белка EGFR, связанного антителом, может изменяться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как те, которые происходят в некоторых раковых опухолях или тому подобное. Если в настоящей заявке приводится ссылка на EGFR, то ссылка относится к EGFR человека, если не указано иное. Сайт связывания антигена, который связывает EGFR, связывает EGFR и множество его вариантов, таких как те, которые экспрессируются на некоторых EGFR-положительных опухолях.

Термин "лиганд EGFR" в рамках настоящего изобретения относится к полипептидам, которые связывают и активируют EGFR. Примеры лигандов EGFR включают EGF, TGF- α , HB-EGF, амфирегулин, бетацеллюлин и эпирегулин, но не ограничиваются ими (обзор Olayioye MA et al.; EMBO J (2000) Vol 19: pp 3159-3167). Термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты природного полипептида.

cMET, также называемый тирозин-протеинкиназа MET или рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR), представляет собой белок, который у человека кодируется геном MET. Белок обладает активностью тирозинкиназы. Первичный одноцепочечный белок-предшественник посттрансляционно расщепляется с образованием альфа-и бета-субъединиц, которые дисульфидно связаны с образованием зрелого рецептора.

Аберрантно активированный cMET может индуцировать рост опухоли, образование новых кровеносных сосудов (ангиогенез), которые снабжают опухоль питательными веществами, и распространение рака на другие органы (метастазирование). cMET не регулируется при многих видах злокачественных новообразований человека, включая рак почек, печени, желудка, молочной железы и головного мозга. Ген cMET известен под множеством различных названий, таких как Прото-онкоген MET, кодирующий Рецепторную Тирозинкиназу; рецептор фактора роста гепатоцитов; тирозин-протеинкиназа MET; рецептор рассеивающего фактора; Прото-онкоген C-MET; рецептор HGF/SF; рецептор HGF; рецептор SF; EC 2.7.10.1; Met Прото-онкоген; EC 2.7.10; DFNB97; AUTS9; RCCP2; C-Met; MET; HGFR; внешние идентификаторы для cMET HGNC: 7029; Entrez Gene: 4233; Ensembl: ENSG00000105976; OMIM: 164860 и UniProtKB: P08581. Номера доступа в основном даны для обеспечения дальнейшего способа идентификации белка cMET в качестве мишени, фактическая последовательность белка cMET, связанного антителом, может отличаться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой

как те, которые происходят в некоторых раковых опухолях или тому подобное. Если в настоящей заявке делается ссылка на cMET, то ссылка относится к cMET человека, если не указано иное. Сайт связывания антигена, который связывает cMET, связывает cMET и множество его вариантов, таких как те, которые экспрессируются на некоторых cMET-положительных опухолях.

Антитело, как правило, распознает лишь часть антигена. Антиген обычно, но не обязательно, является белком. Сайт распознавания или связывания на антигене, связанный антителом, называется эпитопом, при этом эпитоп может быть линейным или конформационным. Связывание антитела с антигеном как правило специфично. "Специфичность" антитела относится к его селективности для конкретного эпитопа, тогда как "аффинность" относится к силе взаимодействия между сайтом связывания антигена антитела и эпитопом, который он связывает.

Типичные антитела согласно настоящему изобретению, раскрытые в настоящей заявке, связывают EGFR и cMET, предпочтительно EGFR человека и cMET человека. Биспецифичное антитело EGFR/cMET согласно настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, связывает EGFR и, при прочих идентичных условиях, по меньшей мере в 100 раз меньше связывает гомологичные рецепторы ErbB-2 и ErbB-4 одного и того же вида. Согласно настоящей заявке, биспецифичное антитело к EGFR/cMET согласно настоящему изобретению связывает cMET и, при прочих идентичных условиях, по меньшей мере в 100 раз меньше связывает рецепторы ErbB-2 и ErbB-4 одного и того же вида. Учитывая, что рецепторы являются рецепторами клеточной поверхности, связывание можно оценить на клетках, которые экспрессируют рецептор(ы). Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно связывает EGFR человека, яванского макака и/или с EGFR мыши.

Антитело, связывающее EGFR и cMET, может связывать и другие белки, если они содержат тот же эпитоп. Следовательно, термин "связывание" не исключает связывания антител с другим белком или белками, содержащими тот же эпитоп. Такое связывание обычно называют перекрестной реактивностью. Биспецифичное антитело EGFR/cMET обычно не связывает другие белки, кроме EGFR и/или cMET, на мембране клеток у постнатального, предпочтительно взрослого человека. Антитело согласно изобретению, раскрытое в настоящей заявке, обычно способно связывать EGFR с аффинностью связывания (т. е. константой равновесной диссоциации K_d) по меньшей мере 1×10^{-6} М, в соответствии с более детальным описанием ниже.

Термин "антитело" в рамках настоящей заявки означает белковую молекулу, предпочтительно принадлежащую к классу белков-иммуноглобулинов. Антитело обычно содержит два вариабельных домена, которые связываются с эпитопом антигена. Такие домены являются производными от или имеют гомологию с последовательностью вариабельного домена антитела. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому настоящей заявке, предпочтительно содержит два вариабельных домена. Антитела для терапевтического применения предпочтительно максимально приближены к природным антителам субъекта,

подлежащего лечению (например, антитела человека для субъектов, представляющих собой человека). Связывание антител может быть определено через специфичность и аффинность. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфично связан связывающим доменом. Как правило, антитела для терапевтического применения могут иметь аффинности до 1×10^{-10} М и выше. Антитела, такие как биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно содержат константные домены (Fc часть) природного антитела. Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, обычно является биспецифичным полноразмерным антителом, предпочтительно подкласса IgG человека. Предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению относятся к подклассу IgG1 человека. Такие антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, могут обладать хорошими свойствами АЗКЦ (ADCC), иметь благоприятный период полувыведения при введении *in vivo* человеку, и также существует технология конструирования СНЗ, которая может обеспечить модифицированные тяжелые цепи, которые предпочтительно образуют гетеро-димеры, а не гомо-димеры при коэкспрессии в клональных клетках. Активность АЗКЦ (ADCC) антитела также может быть улучшена с помощью способов, известных специалистам в данной области.

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно является "полноразмерным" антителом. Термин "полноразмерный" в соответствии с изобретением, раскрытым в настоящей заявке, определяется как содержащее, по существу, полноценное антитело, которое, однако, необязательно обладает всеми функциями интактного антитела. Во избежание сомнений, полноразмерное антитело содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константные (C) и переменные (V) области, которые могут быть разбиты на домены, обозначенные CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Как правило, антитело связывает антиген посредством переменных доменов, содержащихся в Fab-части, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы посредством константных доменов, главным образом через Fc-часть. Полноразмерные антитела согласно изобретению, раскрытому в настоящей заявке, включают антитела, в которых могут присутствовать мутации, обеспечивающие желаемые характеристики. Антитела, в которых один или несколько аминокислотных остатков удаляются без существенного изменения специфичности и/или аффинности полученного антитела, охватываются термином "полноразмерное антитело". Например, антитело класса IgG может иметь 1-20 вставок аминокислотных остатков, делеций или замен или их комбинацию в константной области.

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно является биспецифичным антителом класса IgG, предпочтительно биспецифичным полноразмерным антителом класса IgG1 и более предпочтительно антителом человека класса IgG1. Полноразмерные антитела класса IgG предпочтительны из-за их, как правило, оптимального периода полувыведения и желания остаться как можно ближе к полностью аутологичным (человеческим)

молекулам по причинам иммуногенности. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело класса IgG1, полноразмерное антитело класса IgG2, полноразмерное антитело класса IgG3 или полноразмерное антитело класса IgG4.

5

Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, включает биспецифичное антитело, которое содержит первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR, и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET, где первый вариабельный домен связывает EGFR с

10 аффинностью меньшей, чем у цетуксимаба, который имеет K_d 0,39 нМ (Kim et al 2008). Первый вариабельный домен предпочтительно связывает EGFR с K_d , значение которой находится между $10e-6$ М и $10e-9$ М. Значение K_d предпочтительно находится между $10e-7$ М и $10e-9$ М, предпочтительно между $10e-8$ М и $10e-9$ М. Второй вариабельный домен предпочтительно связывает cMET с K_d ,

15 значение которой составляет $10e-7$ М или меньше. Значение K_d предпочтительно находится между $10e-7$ М и $10e-11$ М. Второй вариабельный домен предпочтительно имеет более высокую аффинность к cMET, чем первый вариабельный домен имеет к EGFR. Другими словами, в этом предпочтительном варианте реализации K_d антитела для cMET меньше, чем K_d антитела для EGFR. В предпочтительном

20 варианте реализации K_d антитела для cMET составляет по меньшей мере 5 и предпочтительно по меньшей мере в 10 раз меньше, чем K_d антитела для EGFR. В этом варианте реализации значения K_d для соответствующих антигенов предпочтительно соответствуют указанным в данном параграфе. Этот соответствующий дисбаланс аффинности позволяет биспецифичному антителу

25 согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, присоединяться к клетке предпочтительно посредством связывания EGFR и блокировать связывание лиганда HGF с cMET.

Вариабельный домен, который может связывать EGFR, предпочтительно является вариабельным доменом, который в контексте двухвалентного

30 моноспецифичного антитела ингибирует EGF-индуцированную гибель клеток A431. Ингибирование EGF индуцированной гибели клеток предпочтительно измеряют при концентрации EGF 10 нМ и 10 мкг/мл антитела. Ингибирование EGF-индуцированной гибели клеток выявляют путем сравнения количества клеток с

35 антителом и без него после 3-7 суток культивирования A431 в условиях, которые являются допустимыми (но для EGF) для роста A431cell. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что связывание EGFR антителом блокирует связывание EGF с EGFR. Вариабельный домен, который может связывать EGFR,

40 предпочтительно является вариабельным доменом, который в контексте двухвалентного моноспецифичного антитела ингибирует EGF-индуцированную пролиферацию клеток VxPC3 или VxPC3-Luc2.

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно ингибирует индуцированную HGF миграцию клеток EBC1 в

45 анализе ранозаживления. Анализ заживления ран предпочтительно является анализом согласно описанию в примерах. Ингибирование заживления ран лучше,

чем у комбинации цетуксимаба и MetMab. Ингибирование, как правило, не 100%. Некоторое заживление ран также происходит в присутствии ингибирующих антител.

5 Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует HGF и EGF/HGF индуцированный рост резистентных к EGFR TKI опухолевых клеточных линий PC-9 и HCC827 при применении в комбинации с TKI. TKI предпочтительно представляет собой гефитиниб.

10 Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует индуцированный HGF рост чувствительной к HGF клетки, предпочтительно линии резистентных к EGFR TKI опухолевых клеток PC-9 или HCC827.

15 Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, ингибирует EGF-индуцированный рост EGF-чувствительной клетки, не индуцируя значительные общие эффекты токсичности, такие как сыпь и диарея и др., ассоциированные с высокоаффинными бивалентными антителами к EGFR. Это делает антитело идеально подходящим для комбинации с TKIs, которые имеют свой собственный профиль токсичности.

20 Индуцированный рост предпочтительно измеряют с помощью анализа, согласно описанию в примерах. Ингибирование, как правило, не 100%. Некоторый рост происходит также в контексте ингибирующего антитела.

Вариабельный домен, который может связывать EGFR и который содержит аминокислотную последовательность MF3370 или ее вариант, согласно описанию в настоящей заявке, предпочтительно связывается с доменом EGFR III (см. Таблицу 4 25 международной патентной заявки PCT/NL2015/050124; WO2015/130172, которая включена в данную заявку путем ссылки). Связывание EGFR вариабельным доменом может быть ингибировано цетуксимабом. Вариабельный домен связывает эпитоп, который отличается от эпитопа, распознаваемого цетуксимабом и залутумумабом. Например, вариабельный домен связывает EGFR мыши, в то время как цетуксимаб и залутумумаб нет, что указывает на то, что один или более 30 остатков, которые отличают домен III EGFR мыши от человеческого, играют важную роль в связывании цетуксимаба и залутумумаба, но не в антителе согласно настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке. Преимущество биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в данной заявке, имеющего перекрестную реактивность EGFR у мыши, человека и яванского макака заключается в том, что это позволяет проводить исследования с 35 применением ксенотрансплантата модели рака человека, которые могут легче поддаваться прогнозированию в отношении эффективности и токсичности, так как антитело также связывается с нормальными клетками мыши, у которых тоже есть 40 рецептор, а также их возможно применять в токсикологических исследованиях на яванском макаке. В одном аспекте изобретение обеспечивает биспецифичное антитело, содержащее первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста EGFR человека, и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть 45 рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой прото-онкогеном MET (сMET),

при этом указанный первый переменный домен может также связывать EGFR мыши, EGFR яванского макака, или оба.

- 5 Переменный домен сMET предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF4356 или ее вариант, согласно описанию в настоящей заявке, и предпочтительно блокирует связывание сMET антителом MetMab. Переменный домен предпочтительно блокирует связывание лиганда HGF с сMET. Переменный домен блокирует связывание антитела MetMab с сMET, когда связывание MetMab с сMET в условиях полумаксимального связывания
- 10 уменьшается по меньшей мере на 40% и предпочтительно по меньшей мере на 60% в присутствии насыщающего количества указанного переменного домена. Переменный домен предпочтительно обеспечен в контексте двухвалентного моноспецифичного антитела. Переменный домен сMET предпочтительно может связывать Sema домен сMET. Переменный домен сMET изобретения может
- 15 конкурировать с 5D5 за связывание сMET или не конкурировать с известными референсными анти-сMET антителами, такими как 5D5. См. Таблицу 2.

- Переменный домен согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке может связать EGFR (первый переменный домен) и предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи с
- 20 последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYX₁X₂NTNYAQKLQG и CDR3, который содержит последовательность X₃X₄X₅X₆HWWLX₇A, где X₁ = N или S; X₂ = A или G; X₃ = D или G; X₄ = R, S или Y; X₅ = H, L или Y; X₆ = D или W и X₇ = D или G.

- Предпочтительно X₁₋₇:
- 25 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
- 30 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G; или
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G.

- В предпочтительном варианте реализации
- 35 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D; или
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D.

- Предпочтительно X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D.

- 40 Аминокислоты, следующие за аминокислотой A в последовательности X₃X₄X₅X₆HWWLX₇A в последовательности CDR3 первого переменного домена, могут изменяться. Последовательность аминокислот, следующая за последовательностью X₃X₄X₅X₆HWWLX₇A, может быть FDY. CDR3 первого переменного домена предпочтительно содержит последовательность
- 45 X₃X₄X₅X₆HWWLX₇AF, предпочтительно X₃X₄X₅X₆HWWLX₇AFD, более предпочтительно X₃X₄X₅X₆HWWLX₇AFDY.

Первый вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность X₃X₄X₅X₆HWWLX₇A.

- 5 Первый вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA. Аминокислоты, следующие за последовательностью LDA в последовательности CDR3 первого вариабельного домена, могут изменяться.
- 10 Последовательность аминокислот, следующая за последовательностью LDA, может быть FDY. CDR3 первого вариабельного домена предпочтительно содержит последовательность DRHWHWWLDAF, предпочтительно DRHWHWWLDAFD, более предпочтительно DRHWHWWLDAFDY.

- 15 Первый вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF3353; MF8229; MF8228; MF3370; MF8233; MF8232; MF3393; MF8227 или MF8226, показанными на Фигуре 7, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющей 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот
- 20 или их комбинаций относительно указанной последовательности. В предпочтительном варианте реализации первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF3353; MF8229; MF8228; MF3370; MF8233; MF8232; MF3393; MF8227 или MF8226, показанными на Фигуре 7.

- 25 Вариабельный домен, который может связывать сMET (второй вариабельный домен), предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами,
- 30 добавлениями аминокислот или их комбинациями. Вариабельная область тяжелой цепи второго вариабельного домена предпочтительно содержит аминокислотную последовательность одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-3; 7; 8; 10; 13; 15; 16; 17; 21; 22 или 23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. Вариабельная область тяжелой
- 35 цепи второго вариабельного домена предпочтительно содержит аминокислотную последовательность одной из последовательностей SEQ ID NO: 2; 7; 8; 10; 13 или 23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. Вариабельная область тяжелой цепи второго
- 40 вариабельного домена предпочтительно содержит аминокислотную последовательность последовательности SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

- 45 В предпочтительном варианте реализации первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQLQG и CDR3, который содержит

последовательность DRHWHWWLDA, предпочтительно DRHWHWWLDAFDY, а второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG и CDR3, который содержит последовательность EYFYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго вариабельных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

В предпочтительном варианте реализации первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQKLQG, CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и где второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи CDR1 TYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG, CDR3, который содержит последовательность EYFYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго вариабельных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

Биспецифичное антитело, которое содержит первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR, и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET, при этом первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNANTNYAQKLQG, CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, а второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG и CDR3, который содержит последовательность EYFYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго вариабельных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

Биспецифичное антитело, которое содержит первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET, при этом первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNANTNYAQKLQG, и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и при этом второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 TYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG и CDR3, который содержит последовательность EYFYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго вариабельных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную

последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

Биспецифичное антитело, которое содержит первый переменный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR и второй переменный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET, при этом первый переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYSGNTNYAQLQ, и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и при этом второй переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG и CDR3 с последовательностью ETYYYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго переменных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

Биспецифичное антитело, которое содержит первый переменный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR и второй переменный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET, при этом первый переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYSGNTNYAQLQG, и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и при этом второй переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 TYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQGFTG и CDR3, который содержит последовательность ETYFYDRGGYPFDP. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго переменных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго переменного домена, как раскрыто в настоящей заявке, предпочтительно содержат, соответственно, аминокислотную последовательность CDR1 - QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, т. е. CDR IGKV1-39 (в соответствии с IMGT). В некоторых вариантах реализации биспецифичного антитела, раскрытых в настоящей заявке, первый и второй переменные домены содержат общую легкую цепь, предпочтительно легкую цепь, показанную на Фигуре 9B.

В другом предпочтительном варианте реализации биспецифичное антитело EGFR/cMET содержит первый переменный домен, который может связывать внеклеточную часть EGFR человека, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи MF3755, показанной на Фигуре 1, и второй переменный домен, который может связывать внеклеточную часть cMET человека, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи MF4297, показанной на Фигуре 1. Переменная область легкой цепи в

указанном первом и втором переменном домене предпочтительно является общей переменной областью легкой цепи, согласно описанию в настоящей заявке. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи первого и второго переменных доменов предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1-QSISY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSISTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT). В предпочтительном варианте реализации антитело содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF3755, показанной на Фигуре 1, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющее 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций относительно указанной последовательности. В предпочтительном варианте реализации первый переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF3755, показанной на Фигуре 1. Переменный домен, который может связывать cMET (второй переменный домен), предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF4297, показанную на Фигуре 1, с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. Переменная область тяжелой цепи второго переменного домена предпочтительно содержит аминокислотную последовательность MF4297, показанную на Фигуре 1.

Термин "биспецифичный" (bs) в контексте настоящего изобретения означает, что антитело способно связывать две различные мишени или два эпитопа на одной и той же мишени, например, где один переменный домен антитела (как определено выше) связывает эпитоп на EGFR, а второй переменный домен связывает эпитоп на cMET. В зависимости от уровня экспрессии, (суб)клеточной локализации и стехиометрии двух антигенов, распознанных биспецифичным антителом, оба Fab-плеча антитела могут одновременно связывать или не связывать свой эпитоп. Одно плечо биспецифичного антитела обычно содержит переменный домен одного антитела, а другое плечо содержит переменный домен другого антитела (то есть одно плечо биспецифичного антитела образовано одной тяжелой цепью в паре с одной легкой цепью, тогда как другое плечо образовано другой тяжелой цепью в паре с легкой цепью). Таким образом, стехиометрия предпочтительного биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, составляет 1:1, связывание EGFR:cMET.

Переменные области тяжелой цепи биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытого в настоящей заявке, обычно отличаются друг от друга, тогда как переменные области легкой цепи предпочтительно одинаковы. Биспецифичное антитело, в котором различные переменные области тяжелой цепи связаны с одной и той же переменной областью легкой цепи, также называют биспецифичным антителом с общей переменной областью легкой цепи (cLcv). Предпочтительно, чтобы константная область легкой цепи также была одинаковой. Такие биспецифичные антитела называются имеющими общую легкую цепь (cLc). Также предложено биспецифичное антитело согласно изобретению, раскрытому в настоящей заявке, в котором оба плеча содержат общую легкую цепь.

Термин "общая легкая цепь" согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, относится к двум или более легким цепям в биспецифичном антителе, которые могут быть идентичными или иметь некоторые различия аминокислотных последовательностей, в то время как специфичность связывания полноразмерного антитела не затрагивается. Например, в рамках определения общих легких цепей в рамках настоящего изобретения, возможно подготовить или найти легкие цепи, которые не идентичны, но все же функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных изменений аминокислот, изменений аминокислот в областях, которые не способствуют или только частично способствуют специфичности связывания в паре с тяжелой цепью, и тому подобное. Термины "общая легкая цепь", "общая LC", "cLC", "одна легкая цепь" с добавлением или без добавления термина "реаранжированный" используются здесь взаимозаменяемо. Термины "общая переменная область легкой цепи", "общая VL", "общая LCv", "cLCv", "одна VL" с добавлением или без добавления термина "реаранжированный" используются здесь взаимозаменяемо. Предпочтительным аспектом настоящего изобретения является то, что биспецифичное антитело имеет общую легкую цепь (переменную область), которая может объединяться по меньшей мере с двумя, и предпочтительно с множеством тяжелых цепей (переменных областей) различной специфичности связывания для образования антител с функциональными антигенсвязывающими доменами (например, WO2009/157771). Общая легкая цепь (переменная область) предпочтительно является легкой цепью человека (переменная область). Общая легкая цепь (переменная область) предпочтительно имеет последовательность зародышевого типа. Предпочтительной последовательностью зародышевого типа является переменная область легкой цепи, которая обладает хорошей термодинамической стабильностью, выходом и растворимостью. Предпочтительной зародышевой легкой цепью является O12. Общая легкая цепь предпочтительно содержит легкую цепь, кодируемую сегментом гена VK зародышевой линии человека, и предпочтительно является реаранжированной легкой цепью IgVk1 зародышевой линии человека kappa-39*01/IGJk1*01 (Фигура 9A). Общая переменная область легкой цепи предпочтительно является переменной областью реаранжированной зародышевой линии человека легкой цепи kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01. Общая легкая цепь предпочтительно содержит переменную область легкой цепи, показанную на Фигуре 9B, или 9D с 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. Общая легкая цепь предпочтительно также содержит константную область легкой цепи, предпочтительно константную область легкой цепи kappa. Нуклеиновая кислота, кодирующая общую легкую цепь, может быть кодон-оптимизирована для клеточной системы, которая применяется для экспрессии белка общей легкой цепи. Кодирующая нуклеиновая кислота может отличаться от последовательности нуклеиновых кислот зародышевой линии.

В предпочтительном варианте реализации легкая цепь содержит область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность сегмента гена O12 / IgVk1-39*01, показанную на Фигуре 9A, с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками,

делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

Выражение "легкая цепь O12" будет использоваться во всем описании в качестве сокращения для "легкой цепи, содержащей вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность сегмента гена O12 / IgVk1-39*01, показанную на Фигуре 9А, с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией". IgVk1-39 - сокращение для Гена Вариабельной области Иммуноглобулина Каппа 1-39. Этот ген также известен как Ген Вариабельной области Иммуноглобулина Каппа 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a или O12. Внешние идентификаторы для гена - HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность для IgVk1-39 приведена на Фигуре 9Е. На ней показана последовательность V-области. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. На Фигуре 9В и 9D показаны две предпочтительные последовательности для IgVk1-39 в комбинации с J-областью. Соединенные последовательности обозначаются как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия-IgVk1-39*01/IGJk1*01 или IgVk1-39*01/IGJk5*01 (номенклатура по данным базы данных IMGT, международный веб-адрес imgt.org).

Предпочтительно, чтобы O12/IgVk1-39*01, содержащая вариабельную область легкой цепи, была зародышевой последовательностью. Кроме того, предпочтительно, чтобы IGJk1*01 или IGJk5*01, содержащая вариабельную область легкой цепи, была зародышевой последовательностью. В предпочтительном варианте реализации вариабельные области легкой цепи IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5 представляют собой зародышевые последовательности.

В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит O12/IgVk1-39*01 зародышевой линии. В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит легкую цепь Каппа IgVk1-39*01/IGJk1*01 или IgVk1-39*01/IGJk5*01. В предпочтительном варианте реализации IgVk1-39*01/IGJk1*01. Вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит зародышевую легкую цепь Каппа IgVk1-39*01/IGJk1 * 01 или легкую цепь каппа IgVk1-39*01/IGJk5*01 зародышевой линии, предпочтительно IgVk1-39*01/IGJk1*01 зародышевой линии.

«Созревшие» В-клетки, продуцирующие антитело с легкой цепью O12, часто продуцируют легкую цепь, которая претерпела одну или несколько мутаций относительно последовательности зародышевой линии, то есть нормальной последовательности в нелимфоидных клетках организма. Процесс, ответственный за эти мутации, часто называют соматической (гипер)мутацией. Получившаяся легкая цепь называется легкой цепью с «созревшей» аффинностью. Такие легкие цепи, когда они получены из последовательности зародышевой линии O12, являются производными -легких цепей O12. В данной заявке выражение "общая легкая цепь" будет включать "общие легкие цепи, производные от легких цепей", а фраза "O12 легкие цепи" будет включать производные от легкой цепи O12. Мутации, вызванные соматической гипермутацией, также могут быть введены искусственно в лаборатории. В лаборатории также могут быть введены другие мутации, не влияющие на свойства легкой цепи в отношении типа, не обязательно количества. Легкая цепь является по меньшей мере легкой цепью O12, если она

содержит последовательность, показанную на Фигуре 9А, Фигуре 9В; Фигуре 9D или Фигуре 9Е с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, показанную на Фигуре 9А; 9В; 9D или 9Е с 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, показанную на Фигуре 9А, Фигуре 9В; Фигуре 9D или Фигуре 9Е с 0-5, предпочтительно 0-4, более предпочтительно 0-3 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, показанную на Фигуре 9А, Фигуре 9В; Фигуре 9D или Фигуре 9Е с 0-2, более предпочтительно 0-1, наиболее предпочтительно 0 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, показанную на Фигуре 9А или Фигуре 9В, с указанными вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь содержит последовательность, показанную на Фиг. 9А. В предпочтительном варианте реализации переменная область легкой цепи содержит последовательность, показанную на Фигуре 9В. Указанные 1, 2, 3, 4 или 5 замен аминокислот предпочтительно являются консервативными заменами аминокислот, вставки, делеции, замены или их комбинации предпочтительно не находятся в области CDR3 цепи VL, предпочтительно не находятся в области CDR1, CDR2 или CDR3 или FR4 области цепи VL.

Общая легкая цепь может иметь легкую цепь лямбда, и поэтому такой вариант также входит в объем изобретения согласно настоящей заявке, однако предпочтительна легкая цепь каппа. Константная часть общей легкой цепи согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может быть константной областью каппа или лямбда-легкой цепи. Предпочтительно, константная область является константной областью легкой цепи каппа, в которой, предпочтительно, указанная общая легкая цепь является легкой цепью зародышевой линии, предпочтительно реаранжированной легкой цепью каппа зародышевой линии человека, содержащей IgVK1-39 генный сегмент, наиболее предпочтительно реаранжированной легкой цепью каппа зародышевой линии человека IgVK1-39*01/IGJK1*01 (Фигура 9). Термины реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии человека IgVk1-39*01/IGJk1*01, IGKV1-39/IGKJ1, huVk1-39 легкая цепь или сокращенно huVk1-39, или просто 1-39 используются взаимозаменяемо во всей заявке.

Клетка, которая продуцирует общую легкую цепь, может продуцировать, например, легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgVk1-39*01/IGJk1*01 и легкую цепь, содержащую переменную область указанной легкой цепи, слитую с лямбда-константной областью.

- В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK или DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 вставок, делеций, замен, добавлений аминокислот в отношении указанной аминокислотной последовательности или их комбинаций. Комбинация вставки, удаления, добавления или замены является комбинацией в соответствии с настоящим изобретением, если выровненные последовательности не отличаются более чем на 5 положений. В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK или DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK. В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK. В другом предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK.
- Вставки, делеции, замены, добавления аминокислот или их комбинации предпочтительно не находятся в области CDR3 вариабельной области легкой цепи, предпочтительно не находятся в области CDR1 или CDR2 вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте реализации вариабельная область легкой цепи не содержит делеции, добавления или вставки в отношении указанной последовательности. В этом варианте реализации вариабельная область тяжелой цепи может иметь 0-5 замен аминокислот относительно указанной аминокислотной последовательности. Замена аминокислоты предпочтительно является консервативной заменой аминокислоты. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержат соответственно аминокислотную последовательность CDR1 - QSISSY, CDR2 – AAS, CDR3 – QQSYSTP, то есть CDR IGKV1-39 (согласно IMGT).

- Биспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, предпочтительно имеют одну комбинацию вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи (VH/VL), которая связывает внеклеточную часть EGFR, и вторую комбинацию VH/VL, которая связывает внеклеточную часть cMET. В

предпочтительном варианте реализации VL в указанной первой комбинации VH/VL аналогична VL в указанной второй комбинации VH/VL. В более предпочтительном варианте реализации VL в первой и второй комбинациях VH/VL идентичны. В предпочтительном варианте реализации биспецифичное антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое имеет одну комбинацию тяжелой/легкой (H/L) цепи, которая связывает внеклеточную часть EGFR, и одну комбинацию H/L цепи, которая связывает внеклеточную часть cMET. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь в указанной первой комбинации цепей H/L аналогична легкой цепи в указанной второй комбинации цепей H/L. В более предпочтительном варианте реализации легкие цепи в первой и второй комбинациях H/L идентичны.

Было опубликовано несколько способов получения клетки-хозяина, экспрессия которой способствует продукции биспецифичного антитела или, наоборот, моноспецифичных антител. В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы клеточная экспрессия молекул антител способствовала продукции биспецифичного антитела, а не продукции соответствующих моноспецифичных антител. Это обычно достигается путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, что они предпочтительно гетеродимеризуются (т. е. димеризуются с тяжелой цепью другой комбинации тяжелой/легкой цепи), чем гомодимеризуются. В предпочтительном варианте реализации биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, содержит две различные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. В настоящей заявке описаны различные совместимые домены гетеродимеризации. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно являются совместимыми доменами гетеродимеризации тяжелой цепи CH3 иммуноглобулина. При применении доменов CH3 дикого типа совместная экспрессия двух различных тяжелых цепей (A и B) и общей легкой цепи приведет к трем различным видам антител, AA, AB и BB. AA и BB являются обозначениями двух моноспецифичных, бивалентных антител, а AB является обозначением биспецифичного антитела. Для увеличения процента желаемого биспецифичного продукта (AB) может применяться технология конструирования CH3, или, другими словами, можно применять тяжелые цепи с совместимыми доменами гетеро-димеризации, согласно описанию ниже. В данной работе описаны различные способы достижения такой гетеродимеризации тяжелых цепей. Один из способов представляет собой получение биспецифичных антител типа "выступ-во-впадину".

Термин "совместимые домены гетеродимеризации" в рамках настоящей заявки относится к белковым доменам, которые сконструированы таким образом, что сконструированный домен A' предпочтительно образует гетеродимеры со сконструированным доменом B' и наоборот, гомодимеризация между A'-A' и B'-B' уменьшается.

В заявке США 13/866,747 (в настоящее время патент США 9,248,181), заявке США 14/081,848 (в настоящее время патент США 9,358,286) и PCT/NL2013/050294 (опубликована как WO2013/157954; включена в данную заявку путем ссылки) раскрыты способы и средства для получения биспецифичных антител с использованием совместимых доменов гетеродимеризации. Эти средства и способы также могут быть эффективно использованы в настоящем изобретении. В частности,

биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно содержит мутации для получения существенной экспрессии биспецифичных полноразмерных молекул IgG в клетках-хозяевах. Предпочтительными мутациями являются замены аминокислот L351K и T366K в первом домене CH3 (тяжелая цепь "KK-вариант") и замены аминокислот L351D и L368E во втором домене (тяжелая цепь "DE-вариант") или наоборот. Патенты США 9,248,181 и US 9,358,286, а также заявка PCT WO2013/157954 (которые включены в данную заявку путем ссылки) демонстрируют, что DE-вариант и KK-вариант предпочтительно спариваются для образования гетеродимеров (так называемых биспецифичных молекул "DEKK"). Гомодимеризация вариантов тяжелых цепей DE (гомодимеры DEDE) предпочтительно не происходит из-за отталкивания между заряженными остатками в области взаимодействия CH3-CH3 между идентичными тяжелыми цепями.

Биспецифичные антитела могут быть получены путем (транзиторной) трансфекции плазмидами, кодирующими легкую цепь и две различные тяжелые цепи, которые CH3-сконструированы для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифичных антител. Продукция этих цепей в одной клетке приводит к предпочтительному образованию биспецифичных антител по сравнению с образованием моноспецифичных антител. Предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифичных полноразмерных молекул класса IgG1 являются замены аминокислот в положениях 351 и 366, например L351K и T366K (нумерация в соответствии с нумерацией EU) в первом домене CH3 ("KK-вариант" тяжелой цепи) и замены аминокислот в положениях 351 и 368, например L351D и L368E во втором домене CH3 ("DE-вариант" тяжелой цепи), или наоборот (см., например, Фигуры 10E и 10F).

В одном варианте реализации комбинация тяжелая цепь/легкая цепь, которая содержит вариабельную область, связывающую EGFR, содержит DE-вариант тяжелой цепи. В этом варианте реализации комбинация тяжелая цепь/легкая цепь, содержащая вариабельную область, которая может связываться с cMET, содержит KK-вариант тяжелой цепи. KK-вариант тяжелой цепи, связывающей cMET, не производит гомодимеров, что делает наблюдаемый эффект ингибирования активации cMET, индуцированной HGF, биспецифичным антителом очень точным. Это позволяет избежать активации cMET, иногда наблюдаемой с бивалентными антителами к cMET (агонизм).

Область Fc опосредует эффекторные функции антитела, такие как комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ (CDC)), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ (ADCC)) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ (ADCP)). В зависимости от терапевтического применения антитела или слитого белка, содержащего Fc, может быть желательно либо уменьшить, либо увеличить эффекторную функцию. Снижение эффекторной функции может быть желательным, когда иммунный ответ должен быть активирован, усилен или стимулирован, как в некоторых вариантах реализации изобретения согласно настоящей заявке. Антитела с пониженными эффекторными функциями могут

применяться, в частности, для нацеливания молекул клеточной поверхности иммунных клеток.

Антитела со сниженными эффекторными функциями предпочтительно представляют собой антитела класса IgG, содержащие модифицированную область СН2/нижнюю шарнирную область, например, для уменьшения взаимодействия Fc-рецептора или для уменьшения связывания C1q. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антитело класса IgG с мутантным СН2 и/или нижним шарнирным доменом, так что взаимодействие биспецифичного антитела класса IgG с Fc-гамма-рецептором снижается. Антитело, содержащее мутантную область СН2, предпочтительно является антителом класса IgG1. Такой СН2 и/или нижний шарнирный домен мутантного антитела класса IgG1 предпочтительно содержит замену аминокислоты в положении 235 и/или 236 (нумерация EU), предпочтительно замену L235G и/или G236R (Фиг.10D).

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно имеет эффекторную функцию. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, предпочтительно обладает антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ (ADCC)). Антитело может быть сконструировано для повышения активности АЗКЦ (см. Cancer Sci. 2009 Sep;100(9):1566-72. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N). Существует несколько способов in vitro для определения эффективности антител или эффекторных клеток в проявлении АЗКЦ (ADCC). Среди них анализы высвобождения хрома-51 [Cr51], анализы высвобождения европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S35]. Обычно меченую клеточную линию-мишень, экспрессирующую определенный поверхностно-экспонированный антиген, инкубируют с антителом, специфичным для этого антигена. После промывания эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецептор CD16, инкубируют совместно с мечеными антителами клетками-мишенями. Лизис клеток-мишеней впоследствии измеряется высвобождением внутриклеточной метки с помощью сцинтилляционного счетчика или спектрофотометрии. В одном аспекте биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, проявляет активность АЗКЦ (ADCC). В таком аспекте биспецифичное антитело может иметь улучшенную активность АЗКЦ (ADCC). В другом аспекте биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, не проявляет активности АЗКЦ (ADCC). В таком аспекте антитело может проявлять уменьшенную АЗКЦ (ADCC) за счет одной или нескольких мутаций СН2, описанных в другом разделе настоящей заявки, и с помощью способов, известных в данной области техники. Одним из способов повышения АЗКЦ (ADCC) антитела является афукозилирование. (См., например, Junttila, T. T., K. Parsons и др. (2010). "Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer." Cancer Research 70(11): 4481-4489). Также предложено биспецифичное антитело согласно изобретению, раскрытому в настоящей заявке, которое является афукозилированным. В качестве альтернативы, или дополнительно, несколько других стратегий могут применяться для достижения

повышения АЗКЦ (ADCC), включая, например, гликоинжиниринг (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) и Eureka Therapeutics) и мутации, которые направлены на улучшение связывания Fc с активирующим низкоафинным FcγRIIIa, и/или на уменьшение связывания с ингибирующим низкоафинным FcγRIIb. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно афукозилируют для повышения активности АЗКЦ (ADCC). Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно содержит уменьшенное количество фукозилирования N-связанной углеводной структуры в области Fc, по сравнению с тем же антителом, продуцируемым в нормальной клетке CHO.

Вариант антитела или биспецифичного антитела, описанный в настоящей заявке, содержит функциональную часть, производное и/или аналог антитела или биспецифичного антитела. Этот вариант сохраняет специфичность связывания (биспецифичного) антитела. Функциональная часть, производное и/или аналог сохраняет специфичность связывания (биспецифичного) антитела. Специфичность связывания определяется способностью связывать внеклеточную часть первого мембранного белка и второго мембранного белка, согласно настоящему описанию.

Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, предпочтительно применяется в организме человека. Предпочтительным антителом изобретения является антитело человека или гуманизированное антитело. Константная область биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, предпочтительно является константной областью человека. Константная область может содержать одно или несколько, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 различий аминокислот по сравнению с константной областью природного антитела человека. Предпочтительно, чтобы константная часть была полностью получена из природного антитела человека. Различные антитела, полученные в настоящей заявке, получены из библиотеки переменных доменов антител человека. Как таковые эти переменные области являются областями человека. Уникальные области CDR могут быть получены от человека, быть синтетическими или получены от другого организма. Переменная область считается гуманизированной переменной областью, когда она имеет аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности переменной области природного антитела человека, за исключением областей CDR. В таких вариантах реализации VH переменного домена антитела, которое связывает EGFR или cMET согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 различий аминокислот по сравнению с переменной областью природного антитела человека, не считая возможных различий в аминокислотной последовательности областей CDR. Переменная область легкой цепи EGFR-связывающего домена и/или cMET-связывающего домена в антителе согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 различий аминокислот по сравнению с переменной

областью природного антитела человека, не считая возможных различий в аминокислотной последовательности областей CDR. Легкая цепь в антителе согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 различий аминокислот по сравнению с вариабельной областью природного антитела человека, не считая возможных различий в аминокислотной последовательности областей CDR. Такие мутации также происходят в природе в контексте соматической гипермутации.

Антитела могут быть получены от различных видов животных, по крайней мере, это относится к вариабельной области тяжелой цепи. Общепринятой практикой является их гуманизация, например, вариабельных областей тяжелой цепи мышей. Существуют различные способы достижения этой цели, среди которых CDR-трансплантация в вариабельную область тяжелой цепи человека с трехмерной структурой, соответствующей трехмерной структуре вариабельной области тяжелой цепи мыши; деиммунизация вариабельной области тяжелой цепи мыши, предпочтительно осуществляемая путем удаления известных или предполагаемых Т- или В-клеточных эпитопов из вариабельной области тяжелой цепи мыши. Удаление обычно происходит путем замены одной или нескольких аминокислот в эпитопе на другую (обычно консервативную) аминокислоту, таким образом, что последовательность эпитопа модифицируется таким образом, что он больше не является Т - или В-клеточным эпитопом.

Деиммунизированные вариабельные области тяжелой цепи мыши менее иммуногенны у человека, чем исходная вариабельная область тяжелой цепи мыши. Предпочтительно, чтобы вариабельная область или домен согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, была затем гуманизирована, например, венирована. При использовании способов венирования внешние остатки, которые легко обнаруживаются иммунной системой, избирательно заменяются остатками антитела человека, чтобы обеспечить гибридную молекулу, которая содержит либо слабо иммуногенную, либо, по существу, не иммуногенную венированную поверхность. Животное, согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно примата, наиболее предпочтительно человека.

Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно содержит константную область антитела человека. В соответствии с различиями в их константных доменах тяжелой цепи антитела группируются в пять классов, или изотипов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Эти классы или изотипы содержат по крайней мере одну из указанных тяжелых цепей, которая названа соответствующей греческой буквой. Предпочтительный вариант реализации включает антитело, 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, т. е. выбрана из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительно, указанная константная область является константной областью IgG1 или IgG4, более

предпочтительно мутированной константной областью IgG1. Некоторое изменение константной области IgG1 имеет место в природе и/или допускается без изменения иммунологических свойств полученного антитела. Вариация также может быть
 5 антитела или его части. Такие особенности, например, описаны здесь в контексте СН2 и СН3. Обычно в константной области допускается примерно 1-10 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций.

Цепь VH на Фигуре 1, 7 или 8 предпочтительно имеет не более 15,
 10 предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций по отношению к цепи VH, показанной на Фигурах 1, 7 или 8, предпочтительно имеет 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций по отношению к цепи VH, показанной на Фигурах 1, 7 или 8, предпочтительно 0, 1, 2, 3 или 4 вставок, делеций, замен или их
 15 комбинаций, предпочтительно 0, 1, 2 или 3 вставки, делеции, замены или их комбинации, более предпочтительно 0; 1 или 2 вставки, делеции, замены или их комбинации, и предпочтительно 0 или 1 вставку, делецию, замену или их комбинации относительно цепи VH, показанной на Фигурах 1, 7 или 8. Одна или несколько вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций
 20 предпочтительно не находятся в области CDR1, CDR2 и/или CDR3 цепи VH. Они также предпочтительно отсутствуют в регионе Fr4. Замена аминокислоты предпочтительно является консервативной заменой аминокислоты.

Рациональные способы эволюционировали в сторону минимизации
 25 содержания остатков вида, не относящегося к человеку, в контексте антитела человека. Существуют различные способы успешного переноса антигенсвязывающего свойства антитела на другое антитело. Связывающие свойства антител могут определяться преимущественно определенной последовательностью в области CDR3, часто поддерживаемой последовательностью
 30 областей CDR1 и CDR2 в вариабельном домене в сочетании с соответствующей структурой вариабельного домена в целом. Аминокислотная последовательность области CDR, в соответствии с указанным в настоящей заявке, определяется с помощью определения по Кабату (Kabat definition). В настоящее время существуют различные способы трансплантации CDR-областей в подходящий вариабельный
 35 домен другого антитела. Некоторые из этих способов рассмотрены в J. C. Almagro¹ и J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, включенной в данную заявку путем ссылки. Изобретение, согласно настоящей заявке, также обеспечивает антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее
 40 первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR, и второй сайт связывания антигена, который связывает cMET, в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, содержит последовательность CDR3 VH, как показано для MF3370 на Фигуре 1, и в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания cMET, содержит область CDR3 VH, как показано для MF4356 на Фигуре 1. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR,
 45 предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF3370 на Фигуре 1. Вариабельная

область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF4356 на Фигуре 1. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH на Фигуре 1, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего. Изобретение согласно настоящей заявке, также обеспечивает антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR и второй сайт связывания антигена, который связывает сМЕТ, в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, содержит последовательность CDR3 VH как показано для MF8233 на Фигуре 7, и в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания сМЕТ, содержит область CDR3 VH, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8233 на Фигуре 7. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH с Фигуры 7 или Фигуры 8, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, также предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR и второй сайт связывания антигена, который связывает сМЕТ, в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, включает в себя и последовательность VH CDR3 как показано для MF3370 на Фигуре 1, и в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания сМЕТ, содержит область VH CDR3, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF3370 на Фигуре 1. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH с Фигуры 7 или Фигуры 8, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, также предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR и второй сайт связывания антигена, который связывает сМЕТ, в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, содержит последовательность VH CDR3 как показано для MF8233 на Фигуре 7, и в котором вариабельный домен, содержащий сайт связывания сМЕТ, содержит область VH CDR3, как показано для MF4356 на Фигуре 8. Вариабельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи

VH, как показано для MF8233 на Фигуре 7. Варибельная область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF4356 на Фигуре 8. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH с Фигуры 7 или Фигуры 8, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, также предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR и второй сайт связывания антигена, который связывает сМЕТ, в котором варибельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, содержит последовательность VH CDR3 как показано для MF8232 на Фигуре 7, и в котором варибельный домен, содержащий сайт связывания сМЕТ, содержит область VH CDR3, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Варибельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8232 на Фигуре 7. Варибельная область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8230 на Фигуре 8. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH с Фигуры 7 или Фигуры 8, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, также предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый сайт связывания антигена, который связывает EGFR и второй сайт связывания антигена, который связывает сМЕТ, в котором варибельный домен, содержащий сайт связывания EGFR, содержит и последовательность VH CDR3 как показано для MF8232 на Фигуре 7, и в котором варибельный домен, содержащий сайт связывания сМЕТ, содержит область VH CDR3, как показано для MF4356 на Фигуре 8. Варибельная область VH, содержащая сайт связывания EGFR, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF8232 на Фигуре 7. Варибельная область VH, содержащая сайт связывания сМЕТ, предпочтительно содержит последовательность области CDR1, области CDR2 и области CDR3 цепи VH, как показано для MF4356 на Фигуре 8. Трансплантация CDR может также применяться для получения цепи VH с областями CDR VH с Фигуры 7 или Фигуры 8, но с другой каркасной областью. Другая каркасная область может принадлежать другой VH человека или другого млекопитающего.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый варибельный домен, который связывает EGFR и второй варибельный домен, который связывает сМЕТ, при этом первый варибельный домен содержит варибельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью

MF3370, показанную на Фигуре 7, имеющую самое большее 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и, предпочтительно, имеющую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замещений аминокислот или их комбинаций, а второй вариабельный домен тяжелой цепи содержит вариабельную область, которая содержит

5 аминокислотную последовательность MF4356, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 23) с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями. Изобретение также обеспечивает антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый

10 вариабельный домен, который связывает EGFR, и второй вариабельный домен, который связывает сMET, причем первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью

MF8233, показанной на Фигуре 7, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющей 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций, и где второй вариабельный домен содержит

15 вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF8230, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 13) с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый

20 вариабельный домен, который связывает EGFR, и второй вариабельный домен, который связывает сMET, причем первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью

MF3370, показанной на Фигуре 7, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющей 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций, и где второй вариабельный домен содержит

25 вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF8230, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 13) с 0-10 предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый

35 вариабельный домен, который связывает EGFR, и второй вариабельный домен, который связывает сMET, причем первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью

MF8233, показанной на Фигуре 7, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющей 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций, и где второй вариабельный домен содержит

40 вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF4356, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 23) с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый

45 вариабельный домен, который связывает EGFR, и второй вариабельный домен, который связывает сMET, причем первый вариабельный домен содержит

вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF8232, показанной на Фигуре 7, имеющей не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющей 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций, и где второй вариабельный домен содержит

5 вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF4356, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 23) с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.

В изобретении, раскрытом в настоящей заявке, предложено антитело человека или гуманизированное биспецифичное антитело, содержащее первый

10 вариабельный домен, который связывает EGFR, и второй вариабельный домен, который связывает cMET, причем первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью MF8232, показанную на Фигуре 7, имеющую не более 10, предпочтительно 0, 1, 2, 3,

15 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций, и где второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MF8230, показанную на Фигуре 8 (SEQ ID NO: 23) с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот

20 или их комбинациями.

Указанные не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4 или 5 замен аминокислот являются предпочтительно консервативными заменами, вставками, делециями, заменами аминокислот или их

25 комбинациями, они предпочтительно не находятся в области CDR3 цепи VH, предпочтительно не в области CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VH и предпочтительно не находятся в области FR4.

Существуют различные способы получения биспецифичных антител. Один способ включает экспрессию двух различных тяжелых цепей и двух различных

30 легких цепей в клетке и сбор продуцируемого клеткой антитела. Антитела, полученные таким способом, обычно содержат набор антител с различными комбинациями тяжелых и легких цепей, некоторые из которых являются желаемыми биспецифичными антителами. Биспецифичное антитело может быть впоследствии выделено из собранного материала. Соотношение биспецифичных и

35 других антител, продуцируемых клеткой, может быть увеличено различными способами. В предпочтительном способе реализации, соотношение увеличивается за счет экспрессии не двух различных легких цепей, а общей легкой цепи в клетке. Когда общая легкая цепь экспрессируется с двумя различными тяжелыми цепями, отношение биспецифичного антитела к другому антителу, которое продуцируется

40 клеткой, значительно улучшается по сравнению с экспрессией двух различных легких цепей. Соотношение биспецифичных антител, продуцируемых клеткой, может быть дополнительно улучшено путем стимуляции спаривания двух различных тяжелых цепей друг с другом по сравнению со спариванием двух идентичных тяжелых цепей. Раскрыты способы и средства получения

45 биспецифичных антител (из одной клетки), при этом обеспечены средства, способствующие образованию биспецифичных антител по сравнению с

образованием моноспецифичных антител. Эти способы также могут быть эффективно использованы в настоящем изобретении. Таким образом, изобретение, согласно настоящей заявке, в одном аспекте обеспечивает способ получения биспецифичного антитела из одной клетки, причем указанное биспецифичное антитело содержит два домена СНЗ, которые способны образовывать область связывания (интерфейс), причем указанный способ включает обеспечение в указанной клетке а) первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, содержащую 1-й домен СНЗ, б) второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, содержащую 2-й домен СНЗ, причем указанные молекулы нуклеиновой кислоты обеспечены средствами для предпочтительного спаривания указанных тяжелых цепей, содержащих 1-й и 2-й домены СНЗ, указанный способ также включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина, с обеспечением возможности экспрессии указанных двух молекул нуклеиновых кислот и сбор указанного биспецифичного антитела из культуры. Указанные первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты могут быть частью одной и той же молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или средства доставки гена и могут быть интегрированы в один и тот же участок генома клетки-хозяина. В качестве альтернативы, указанные первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот обеспечены в указанной клетке по отдельности.

Предпочтительный вариант реализации обеспечивает способ получения биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, из одной клетки, причем указанное биспецифичное антитело содержит два домена СНЗ, которые способны образовывать область связывания (интерфейс), указанный способ включает обеспечение:

- клетки, имеющей а) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания антигена, который связывает EGFR и который содержит 1-й домен СНЗ, и б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания антигена, который связывает ErbB-3 и который содержит 2-й домен СНЗ, причем указанные молекулы нуклеиновой кислоты обеспечены средствами для предпочтительного спаривания указанных 1-го и 2-го доменов СНЗ,

указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки и обеспечения экспрессии белков, кодируемых указанными двумя молекулами нуклеиновых кислот, и сбор указанного биспецифичного антитела класса IgG из культуры. В особо предпочтительном варианте реализации указанная клетка также имеет третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую общую легкую цепь. Указанная первая, вторая и третья молекулы нуклеиновой кислоты могут быть частью одной и той же молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или носителя для доставки гена и могут быть интегрированы в одном и том же участке генома клетки-хозяина. В качестве альтернативы указанные первая, вторая и третья молекулы нуклеиновых кислот обеспечивают указанной клетке по отдельности. Предпочтительная общая легкая цепь основана на O12, предпочтительно это реаранжированная легкая цепь каппа IgVκ1 39*01/IgJκ1*01 зародышевой линии человека, как описано выше. Средствами для преимущественного спаривания указанного 1-го и указанного 2-го СНЗ-домена

предпочтительно являются соответствующие мутации в СНЗ-домене кодирующих областей тяжелой цепи. Предпочтительными мутациями для преимущественного получения биспецифичных антител являются замены аминокислот L351K и T366K (EU нумерация) в первом домене СНЗ и замены аминокислот L351D и L368E во втором домене СНЗ или наоборот. Также предложен способ согласно настоящему изобретению, раскрытому настоящей заявке, для получения биспецифичного антитела, в котором указанный первый домен СНЗ содержит замены аминокислот L351K и T366K (EU-нумерация) и в котором указанный второй домен СНЗ содержит замены аминокислот L351D и L368E, причем указанный способ также включает стадию культивирования указанной клетки и обеспечения экспрессии белков, кодируемых указанными молекулами нуклеиновых кислот, и сбора указанного биспецифичного антитела из культуры. Также предложен способ получения биспецифичного антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, в котором указанный первый домен СНЗ содержит замены аминокислот L351D и L368E (EU-нумерация) и в котором указанный второй домен СНЗ содержит замены аминокислот L351K и T366K, причем указанный способ также включает стадию культивирования указанной клетки и обеспечения экспрессии указанных молекул нуклеиновых кислот и сбора указанного биспецифичного антитела из культуры. Антитела, которые могут быть получены этими способами, также являются частью настоящего изобретения. Домены гетеро-димеризации СНЗ предпочтительно являются доменами гетеро-димеризации антитела класса IgG1. Константные области тяжелой цепи, содержащие домены гетеро-димеризации СНЗ, предпочтительно являются константными областями антитела класса IgG1.

В одном варианте реализации изобретение включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела. Молекула нуклеиновой кислоты (обычно *in vitro*, выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты) предпочтительно кодирует вариабельную область тяжелой цепи, показанную на Фигуре 7 или Фигуре 8, или вариабельную область тяжелой цепи, показанную на Фигуре 7 или Фигуре 8, имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или их комбинаций. В предпочтительном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит кодон-оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, показанную на Фигуре 7 или Фигуре 8. Кодон-оптимизация выбрана для вида и/или типа клетки, продуцирующей антитело. Например, для СНО последовательность нуклеиновых кислот кодон-оптимизирована для клеток китайского хомячка. В настоящем изобретении также предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь, показанную на Фигуре 7 или Фигуре 8.

Молекула нуклеиновой кислоты, которая применяется в изобретении, раскрытом в настоящей заявке, обычно, но не исключительно, является рибонуклеиновой кислотой (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК). Альтернативные нуклеиновые кислоты доступны для специалиста в данной области. Например, нуклеиновая кислота согласно изобретению, раскрытому в

настоящей заявке, содержится в клетке. Когда указанная нуклеиновая кислота экспрессируется в указанной клетке, указанная клетка может продуцировать антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке.

Поэтому в одном варианте реализации изобретение включает клетку, содержащую антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, и/или нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Указанная клетка предпочтительно является клеткой животного, более предпочтительно клеткой млекопитающего, более предпочтительно клеткой примата, наиболее предпочтительно клеткой человека. Подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, и/или нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке.

Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, также обеспечивает клетку, содержащую антитело, согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Предпочтительно указанная клетка (обычно *in vitro*, выделенная или рекомбинантная клетка) продуцирует указанное антитело. Указанная клетка также может быть консервированной клеткой, которая способна продуцировать указанное антитело при извлечении из хранилища и культивировании. В предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6™. В особо предпочтительном варианте реализации указанная клетка является клеткой CHO. Также предложена клеточная культура, содержащая клетку согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Различные учреждения и компании разработали клеточные линии для крупномасштабного производства антител, например, для клинического применения. Неограничивающими примерами таких клеточных линий являются клетки CHO, NS0 или клетки PER C6™. Эти клетки также применяют для других целей, таких как производство белков. Клеточные линии, разработанные для промышленного производства белков и антител, далее называются промышленными клеточными линиями. Таким образом, предпочтительный вариант реализации включает применение клеточной линии, разработанной для крупномасштабного производства антитела, для производства антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, включая предпочтительно клетку для производства антитела, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует VH, VL и/или тяжелую цепь, показанную на Фигуре 7 или Фигуре 8.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения антитела, включающий культивирование клетки согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, и сбор указанного антитела из указанной культуры. Предпочтительно указанную клетку культивируют в бессывороточной питательной среде. Предпочтительно указанная клетка приспособлена для суспензионного роста. Также предложено антитело, которое можно получить способом получения антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Антитело

предпочтительно очищают от среды культивирования. Предпочтительно указанное антитело является очищенным аффинным способом.

Клетка согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, является, например, клеточной линией гибридомы, клеткой CHO, клеткой 293F, клеткой NS0 или клеткой другого типа, известного своей пригодностью для производства антител в клинических целях. В особо предпочтительном варианте реализации указанная клетка является клеткой человека. Предпочтительно клетка, которая трансформируется областью аденовируса E1 или ее функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой линии клеток является клеточная линия PER.C6TM или ее эквивалент. В особо предпочтительном варианте реализации указанная клетка является клеткой CHO или ее вариантом. Предпочтительно вариант, который применяет векторную систему Глутаминсинтетазы (GS) для экспрессии антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, могут быть получены на уровнях > 50 мг/л после транзитной трансфекции в суспензионные клетки 293F. Биспецифичные антитела могут быть очищены до чистоты более 98% с выходом > 70%. Аналитические исследования характеристик показывают биспецифичные профили антител класса IgG1, которые сопоставимы с бивалентными моноспецифичными антителами класса IgG1. С точки зрения функциональной активности биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может демонстрировать превосходную эффективность по сравнению с цетуксимабом *in vitro* и *in vivo*.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит предпочтительно фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель.

Антитело может содержать метку, предпочтительно метку для визуализации *in vivo*. Такая метка обычно не нужна для терапевтического применения. Например, при использовании в диагностике метка может быть полезной. Например, при визуализации клеток-мишеней в организме. Различные метки являются подходящими, и многие из них хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте реализации метка является радиоактивной меткой для обнаружения. В другом предпочтительном варианте метка представляет собой инфракрасную метку. Предпочтительно инфракрасная метка подходит для визуализации *in vivo*. Различные инфракрасные метки доступны специалисту в данной области. Предпочтительными инфракрасными метками являются, например, IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye 700DX; IRDye 800RS IRDye 650; IRDye 700 phosphoramidite; IRDye 800 phosphoramidite (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Lincoln, Nebraska).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения субъекта, у которого имеется опухоль или существует риск возникновения указанной опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или

фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке. Опухоль предпочтительно является EGFR, cMET или EGFR/cMET положительной опухолью. Перед началом указанного лечения предпочтительно также определить, имеет ли указанный субъект такую EGFR, cMET или EGFR/cMET положительную опухоль. Изобретение также обеспечивает антитело или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, для применения в лечении субъекта, который имеет или подвержен риску наличия EGFR, cMET или EGFR/cMET положительной опухоли.

Чтобы установить, является ли опухоль EGFR-положительной, специалист в данной области техники может, например, определить наличие амплификации EGFR и/или иммуногистохимического окрашивания. По крайней мере 10% опухолевых клеток в биопсии должны быть положительными. Биопсия также может содержать 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или больше положительных клеток. Чтобы установить, является ли опухоль cMET-положительной, специалист в данной области техники может, например, определить амплификацию cMET и/или окрашивание в иммуногистохимии. По крайней мере 10% опухолевых клеток в биопсии должны быть положительными. Биопсия также может содержать 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или больше положительных клеток.

Изобретение, согласно настоящей заявке, может быть применено к широкому спектру раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких, включая немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря и тому подобное. Опухоль может быть EGFR, cMET или EGFR/cMET положительным раком. Вариант реализации изобретения может предпочтительно лечить положительный рак, который является раком молочной железы, таким как рак молочной железы на ранней стадии. В другом варианте реализации изобретения предпочтительно можно лечить EGFR, cMET или EGFR/cMET положительный рак, который является колоректальным раком. Изобретение, согласно настоящей заявке, может быть применено к широкому спектру EGFR, cMET или EGFR/cMET положительных раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких, включая немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря и тому подобное. Субъект предпочтительно является субъектом, представляющим собой человека. Субъект предпочтительно является субъектом, соответствующим критериям включения и ни одному из критериев невключения для терапии антителами с использованием специфичных антител EGFR, таких как цетуксимаб. В предпочтительном варианте реализации изобретение может предпочтительно лечить субъекта, имеющего опухоль, предпочтительно EGFR/cMET-положительный рак, предпочтительно опухоль/рак с резистентным к EGFR RTK фенотипом, резистентным к моноклональному антителу к EGFR фенотипом, или их комбинацией.

Количество антител, вводимых пациенту, обычно находится в терапевтическом окне, что означает, что применяют достаточное количество для получения

терапевтического эффекта, в то время как количество не превышает порогового значения, приводящего к неприемлемой степени побочных эффектов. Чем меньше количество антител, необходимых для получения желаемого терапевтического эффекта, тем больше, как правило, будет терапевтическое окно. Поэтому

5 предпочтительным является антитело согласно изобретению, раскрытому в настоящей заявке, оказывающее достаточный терапевтический эффект при низкой дозировке. Дозировка может быть в пределах режима дозирования цетуксимаба. Дозировка также может быть ниже.

10 Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно индуцирует меньшую кожную токсичность по сравнению с цетуксимабом при прочих аналогичных условиях. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, предпочтительно производит меньше провоспалительных хемокинов, предпочтительно CXCL14, по сравнению с цетуксимабом в других аналогичных

15 условиях. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, предпочтительно индуцирует меньшее нарушение антимикробных РНКаз, предпочтительно РНКазы 7, по сравнению с цетуксимабом при прочих аналогичных условиях.

20 Настоящее изобретение описывает среди прочего антитела, которые нацелены на рецепторы EGFR и cMET и приводят к мощному ингибированию пролиферации раковых клеточных линий *in vitro* и ингибированию роста опухоли *in vivo*. Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может сочетать низкие профили токсичности с высокой

25 эффективностью. Антитела согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, могут быть полезны в различных типах и линиях направленной на EGFR терапии. Антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, может иметь увеличенное терапевтическое окно по сравнению с антителом, которое связывает один и тот же антиген(ы) обоими плечами. Биспецифичное

30 антитело согласно настоящему изобретению, согласно настоящей заявке, может проявлять лучшие ингибирующие рост эффекты *in vitro*, *in vivo* или их комбинацию по сравнению с антителом цетуксимаб.

Изобретение также обеспечивает биспецифичное антитело согласно

35 настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, для применения в лечении субъекта, который может иметь один или несколько из множества различных видов опухолей. Опухоль может быть EGFR положительной опухолью, cMET положительной опухолью или EGFR и cMET положительной опухолью. Опухоль может быть раком молочной железы; раком толстой кишки, раком

40 поджелудочной железы, раком желудка, раком яичников, колоректальным раком, раком головы и шеи, раком легких, включая немелкоклеточный рак легких или рак мочевого пузыря. Опухоль может быть резистентна к лечению ингибитором тирозинкиназы EGFR. Ингибитором тирозинкиназы EGFR предпочтительно является эрлотиниб, gefitinib или afatinib, аналог эрлотиниба, gefitinиба или

45 afatinиба или комбинация одного или нескольких соответствующих соединений и/или их аналогов. Лечение предпочтительно дополнительно включает лечение

ингибитором тирозинкиназы EGFR. При совместном лечении ингибитором тирозинкиназы EGFR опухоль может быть резистентной к лечению ингибитором тирозинкиназы EGFR. Совместное лечение по крайней мере частично восстанавливает чувствительность опухоли к ингибитору тирозинкиназы.

5 Ингибитор тирозинкиназы EGFR может быть ингибитором тирозинкиназы EGFR первого поколения. Примерами клинически значимых ингибиторов тирозинкиназы EGFR первого поколения являются эрлотиниб и гефитиниб. В этом и других вариантах реализации опухоль может быть HGF-ассоциированной опухолью.

10 EGFR-положительная опухоль обычно представляет собой опухоль, которая имеет активирующие мутации EGFR. Активирующая мутация EGFR представляет собой мутацию EGFR, которая приводит к активации сигнального пути EGF/EGFR. Активирующая мутация EGFR может быть важна для ракового состояния опухоли. Одним из способов, с помощью которого такие опухоли могут стать

15 нечувствительными к направленной на EGFR терапии, является активация сигнального пути HGF/cMET. Опухоль может быть HGF-ассоциированной опухолью. Активация сигнального пути cMET/HGF является одним из способов, с помощью которого EGFR-положительная опухоль может ускользать от лечения с помощью направленной на EGFR терапии. Путь cMET/HGF может быть активирован

20 различными способами. В области техники описаны различные способы активации, некоторые из которых подробно описаны в настоящей заявке. Антителу согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, особенно подходит для лечения опухолей, в которых активация сигнального пути cMET/HGF связана с присутствием или избытком HGF. Такие cMET-положительные опухоли называются

25 HGF-ассоциированными опухолями или HGF-зависимыми опухолями. Антителу согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, также можно применять, по крайней мере частично, для ингибирования этого возможного механизма ускользания EGFR-положительных опухолей. Такие опухоли могут ускользать от направленной на EGFR терапии посредством избирательного

30 разрастания опухолевых клеток, в котором, кроме того, активируется сигнальный путь cMET/HGF. Такие клетки могут присутствовать в начале направленной на EGFR терапии. Такие клетки обладают избирательным преимуществом роста по сравнению с HGF/cMET сигналинг-отрицательными опухолевыми клетками. Опухоль может быть опухолью, в которой активирован сигнальный путь HGF/cMET.

35 Опухоль может быть опухолью, которая связана с повышенным уровнем фактора роста гепатоцитов (HGF) или гиперэкспрессией рецептора HGF c-Met. Опухоль может быть опухолью, рост которой обусловлен EGF и/или HGF. Считается, что опухоль управляется определенным фактором роста, если сигнальный путь активируется в клетках опухоли в ответ на присутствие фактора роста, и удаление

40 фактора роста приводит к ингибированию роста клеток опухоли. Уменьшение может быть измерено посредством уменьшения деления клетки и/или индуцированного убийства клетки, такого как апоптоз. Опухоль является HGF-ассоциированной опухолью, если в условиях, которые в противном случае были бы пермиссивными для роста опухоли, опухоль растет или растет быстрее в присутствии HGF.

45 Направленная на EGFR терапия различных опухолей была рассмотрена Vecchione и др. в "EGFR-targeted therapy." Experimental cell research Vol 317 (2011):

2765-2771. В общем случае направленная на EGFR терапия представляет собой терапию молекулой, которая взаимодействует с EGFR и ингибирует EGFR-опосредованную сигнализацию в клетке.

5 Способ лечения или антитело для применения в лечении, в соответствии с заявленным изобретением, предпочтительно также включает этап определения, является ли опухоль HGF-ассоциированной опухолью.

Антитело согласно настоящему изобретению, раскрытому в настоящей заявке, может ингибировать рост HGF-ассоциированной опухоли.

10

В некоторых вариантах реализации, в которых вариабельный домен, связывающий сMET, описывается как имеющий последовательность CDR2 "WINTYTGDPITYAQQFTG", последовательность CDR2 также может быть "WINTYTGDPITYAQQFT".

15

Если в данной заявке диапазоны указаны между 1 и 2, то диапазон включает числа 1 и 2. Например, диапазон между 2-5 включает числа 2 и 5.

20

Если в настоящей заявке приводится ссылка на афинность, которая выше, чем другая, то K_d = ниже, чем другая K_d . Во избежание сомнений, K_d 10^{-9} М ниже, чем K_d 10^{-8} М. Афинность антитела с K_d 10^{-9} М для мишени выше, чем при K_d 10^{-8} М.

25

Ссылка в настоящей заявке на патентный документ или другой цитируемый материал, не должна рассматриваться как признание того, что этот документ или материал был известен, или что содержащаяся в нем информация была частью общего знания на дату приоритета любого пункта формулы изобретения.

30

В целях ясности и краткого описания признаки описаны здесь как часть одного и того же или отдельных вариантов реализации, однако следует иметь в виду, что область применения изобретения, согласно настоящей заявке, может включать варианты реализации, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

35

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Аминокислотная последовательность вариабельных областей тяжелой цепи вариабельных доменов, о которых говорится в настоящей заявке.

40

Фигура 2. Функциональность анти-EGFR cLC двухвалентных антител в ингибировании EGF-индуцированной смерти клеток A431. Ось Y (значения) отображает показания флуоресценции в анализе, отображающие число метаболически активных клеток в зависимости от концентрации применяемого антитела (ось X). PG3370 способно ингибировать EGF-индуцированную гибель

45

клеток и поэтому демонстрирует усиленный рост клеток с увеличением

концентрации антител. Молекулы, имеющие вариабельную область аминокислотных последовательностей цетуксимаба/Эрбитукса, указанные здесь как цетуксимаб или референсное антитело цетуксимаб, применяли в экспериментах в качестве внутреннего стандарта (черные точки).

5

Фигура 3. Влияние биспецифичных молекул сMETхEGFR на заживление ран в клетках H385 (панель А) и EBC-1 (панель В).

Клетки инкубировали либо без (имитационный контроль), либо с 12,5 нг/мл EGF, либо с 15 нг/мл HGF, либо с комбинацией HGF и EGF (15 нг/мл и 12,5 нг/мл) с добавлением 5 индивидуальных биспецифичных молекул сMETхEGFR. В качестве контроля был включен цетуксимаб в комбинации с 2994 Fab. Ось Y показывает процент ранозаживления, измеренный с помощью цейтраферной микроскопии.

10

Фигура 4. Анализ FACS в анализе экспрессии EGFR и сMET в клетках NSCLC, Hcc827 и PC-9 с резистентностью к TKI.

15

(А) Экспрессия EGFR (ось x) и сMET (ось y) были охарактеризованы в обеих клеточных линиях с использованием флуоресцентно меченых антител. Все клетки HCC827 экспрессируют EGFR, и могут быть подразделены на EGFR^{high}, сMET^{pos} популяции и EGFR^{pos}, сMET^{neg} популяции. Клетки PC-9 содержат

20

небольшую популяцию клеток EGFR^{high} и сMET^{pos} и минимальную популяцию клеток EGFR^{pos} и сMET^{neg}.

(В) график, представляющий распределение различных популяций клеток в клетках PC-9 и HCC827.

25

Фигура 5. Пример влияния PB8532 и PB8388 на индуцированную HGF резистентность к ингибиторам TKI в клетках PC-9 (панель А) и HCC827 (панель В).

Клетки предварительно обрабатывали биспецифичными PB8532, PB8388 или смесью цетуксимаб/5D5 Fab и инкубировали с HGF и/или EGF в комбинации с ингибитором TKI, после чего измеряли пролиферацию. PB8532 ингибирует HGF-опосредованную и EGF-опосредованную резистентность к гефитинибу в клетках PC-9 и HCC827.

30

Фигура 6. Влияние обработки указанными антителами на HGF-индуцированное фосфорилирование сMET или EGF-индуцированное фосфорилирование EGFR в клетках PC-9 и HCC827. Антитела (100 нМ) инкубировали в течение 15 минут при 37°C, после чего генерировали клеточные экстракты и применяли для вестерн-блот анализа для выявления (p)EGFR и (p)сMET. Антитело против винкулина было включено в качестве контроля белковой нагрузки.

35

Фигура 7. MF3370 и ее варианты. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в MF8226 подчеркнуты слева направо. CDR в других последовательностях находятся в соответствующих положениях.

40

Фигура 8. MF4356 и ее варианты. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в MF4356 подчеркнуты слева направо. CDR в других последовательностях находятся в соответствующих положениях.

45

Фигура 9. Общая легкая цепь, применяемая в моно-и биспецифичных антителах класса IgG.

Фигура 9A: Общая аминокислотная последовательность легкой цепи. Фигура 9B:

- 5 Последовательность ДНК и трансляция общей легкой цепи переменного домена (IGKV1-39/jk1). Фигура 9C: Последовательность ДНК и трансляция константной области общей легкой цепи. Фигура 9D: Трансляция переменного домена общей легкой цепи IGKV1-39/jk5. Фигура 9E: V-область GKV1-39A.

- 10 **Фигура 10.** Тяжелые цепи IgG для генерации биспецифичных молекул.

Фигура 10A: Область CH1. Фигура 10B: область шарнира. Фигура 10C: Область CH2.

Фигура 10D: CH2, содержащая молчащие замены L235G и G236R. Фигура 10E: Домен CH3, содержащий замены L351K и T366K (KK). Фигура 10F: домен CH3, содержащий замены L351D и L368E (DE).

15

Фигура 11. Ингибирование связывания EGF с рекомбинантным EGFR в ИФА.

Биотинилированный EGF связывал EGFR в виде покрытия в присутствии серийных разведений антител класса IgG. Цетуксимаб применяли в качестве положительного контроля, а PG2708 - в качестве отрицательного контрольного антитела (Neg ctrl Ab). Связывание EGF было выявлено с помощью стрептавидина и пероксидазы хрена HRP.

20

Фигура 12. Определение перекрестной реактивности EGFR яванского макака

способом анализа FACS. CHO-K1 клетки были трансфицированы конструктом

- 25 EGFR человека и EGFR яванского макака. Антитела в концентрации 5 мкг/мл

связывали трансфицированные клетки и клетки CHO-K1. Цетуксимаб применяли в качестве положительного контроля, а PG2708 - в качестве отрицательного контрольного антитела (Neg ctrl Ab). Связанные антитела были выявлены при помощи конъюгированного с фикоэритрином (PE) антитела.

30

Фигура 13. Определение перекрестной реактивности EGFR и cMET мыши способом

ИФА. Верхняя панель: Фиксированную концентрацию антител (5 мкг/мл)

испытывали в серийных титрах на планшетах для микротитрования, покрытых EGFR мыши и EGFR человека. Антитела против EGFR и PG2708 (neg Ctrl Ab)

- 35 связывались, и их выявляли при помощи конъюгированного с HRP антитела.

Нижняя панель: серийные титры антител связывали cMET человека и мыши в виде покрытия. Перекрестно-реактивное антитело человека/мыши BAF527 было включено в качестве положительного контрольного антитела, а PG2708 было добавлено в качестве отрицательного контрольного антитела (Neg Ctrl Ab).

- 40 Связанные антитела выявляли с помощью стрептавидина HRP.

Фигура 14. Ингибирование лигандзависимой пролиферации N87. Серийные титры антител инкубировали с клетками N87 в присутствии HGF (A), EGF (B) или EGF/HGF (C). Пролиферацию клеток измеряли при помощи аламарового синего.

- 45 Fab 5D5/цетуксимаб в эквимоллярной концентрации был включен в качестве положительного контрольного антитела. На оси ординат (оси Y) отображена

интенсивность флуоресценции как показатель пролиферации клеток. На оси X представлены различные концентрации исследуемых антител.

Фигура 15. Пример активности АЗКЦ (ADCC) биспецифичных антител сMETхEGFR в клетках N87 (А) и MKN-45 (Б) с использованием репортерного анализа высокой аффинности FcγIIIa АЗКЦ (ADCC). Ось X отображает добавленную концентрацию антител. Ось Y отображает люминесценцию (RLU) как показатель активности АЗКЦ (ADCC). Анти-EGFR антитело цетуксимаб было включено в качестве положительного контрольного антитела.

Фигура 16. Влияние HGF на эффективность ТКИ эрлотиниба и гефитиниба в клетках PC-9 (А) и HCC827 (В). Клетки инкубировали при повышении концентрации HGF (от 0 до 120 нг/мл) в комбинации с 300 нМ эрлотиниба или гефитиниба, после чего измеряли пролиферацию клеток. В обеих клеточных линиях HGF индуцировал дозозависимую резистентность к ТКИ.

Фигура 17. Тестирование аффинного связывания усиленных АЗКЦ (ADCC) вариантов С-MET х EGFR. Клетки CHO-K1, стабильно экспрессирующие EGFR (А), или клетки MKN-45, эндогенно экспрессирующие с-MET (В), инкубировали в количестве 2×10^5 клеток/лунку при повышении концентрации антитела, как указано. После промывания выявляли связывание с IgG-PE человека (3 мкг/мл). Окрашенные клетки анализировали при помощи системы iQue и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Контрольными антителами были MF1337хMF1337; ТТхТТ отрицательный контроль; темные треугольники внизу) и MF4356хMF3770 (PB8532p04; с-METхEGFR положительный контроль для с-MET; черные треугольники). ТТ обозначает столбчатый анатоксин. АЗКЦ (ADCC) указывает на антитела с повышенной функцией АЗКЦ (ADCC) посредством котрансфекции с ДНК, кодирующей фермент RMD для удаления остатка фукозы из Fc-области IgG1.

Фигура 18. Результаты репортерного анализа АЗКЦ (ADCC) для подтверждения повышенной эффекторной функции АЗКЦ (ADCC). Экспрессирующие EGFR клетки ВхРС-3 (слева) или с-MET-экспрессирующие клетки MKN-45 (справа) смешивали с эффекторными клетками АЗКЦ (ADCC) в соотношении Е:Т 15:1 и инкубировали в присутствии титров тестируемого антитела (0,01-10 мкг/мл). Через 6 часов добавляли реагент Bio-Glo и измеряли люминесценцию с помощью считывающего устройства для микропланшетов. Чем выше уровень люминесценции, тем выше степень взаимодействия между клетками-мишенями и эффекторами, индуцируемая тестируемым антителом. Верхние панели показывают результаты анализа высокой аффинности, а нижние панели - результаты анализа низкой аффинности. Отрицательным контролем было антитело PG1337p218 (анти-ТТ, светлые треугольники внизу); другими контролями были антитела 3178х4280 (HER3 х EGFR, с повышенной АЗКЦ (ADCC), светлые закрашенные круги (вверху в левой верхней панели); 3178х4280 (HER3 х EGFR), с неповышенной АЗКЦ (ADCC), черные кресты, внизу); 4356х3370 (с-MET х EGFR), с повышенной АЗКЦ (ADCC), незакрашенные светлые круги); 3370х4356 (EGFR х с-Met, с неповышенной АЗКЦ

(ADCC), черные крестики и пунктирные линии); и цетуксимаб (анти- EGFR), маленькие черные круги).

Фигура 19. Эрлотиниб индуцирует противоопухолевый ответ у мышей NGS-hHGFki, которым трансплантировали клетки HCC827, до тех пор, пока мыши получают лечение. Черная стрелка указывает на начало лечения.

Фигура 20. PB8532 самостоятельно и в комбинации с эрлотинибом индуцирует противоопухолевый ответ у мышей NGS-hHGFki, которым трансплантировали клетки HCC827. Черная стрелка указывает на начало лечения; серые стрелки по оси X указывают на еженедельное введение антител.

Фигура 21. Противоопухолевый ответ, индуцированный только PB8532 и в комбинации с эрлотинибом, превосходит таковой эрлотиниба, даже после прекращения лечения. Черная стрелка указывает на начало лечения; серые стрелки по оси X указывают на еженедельное введение антител.

Фигура 22. Противоопухолевый ответ, индуцированный только PB8532 и в комбинации с эрлотинибом, превосходит таковой эрлотиниба. Черная стрелка указывает на начало лечения; серые стрелки по оси X указывают на еженедельное введение антител. Лечение с помощью сМЕТ антитела LY2875358 с и без лечения эрлотинибом было менее эффективным, чем PB8532 даже без лечения эрлотинибом.

Фигура 23. Противоопухолевый ответ, индуцируемый биспецифичным антителом сМЕТхEGFR PB19478, эффективен также в том случае, когда опухоль развивает резистентность к эрлотинибу. Черные стрелки указывают на начало лечения эрлотинибом и начало лечения PB19478.

ПРИМЕРЫ

В рамках настоящей заявки, термин «MFXXXX», где X независимо является цифрой 0-9, относится к Fab, содержащему вариабельный домен, в котором VH имеет аминокислотную последовательность, обозначенную 4-мя цифрами. Если не указано иное, вариабельная область легкой цепи вариабельного домена обычно имеет последовательность, показанную на Фигуре 9А, обычно 9В. "MFXXXX VH" относится к аминокислотной последовательности VH, обозначенной 4-мя цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи, которая обычно взаимодействует с константной областью легкой цепи. PG относится к моноспецифичному антителу, содержащему идентичные тяжелые и легкие цепи. PB относится к биспецифичному антителу с двумя разными тяжелыми цепями. Вариабельные области VH тяжелых цепей различаются и, как правило, также область CH3, где одна из тяжелых цепей имеет мутацию KK своего домена CH3, а другая имеет соответствующую мутацию DE своего домена CH3 (см. для справки PCT/NL2013/050294 (опубликовано как WO2013/157954)).

Пример 1: Материалы и методы

Клеточные линии:

Были приобретены клеточные линии EBC-1 [JCRB0820], PC-9 [RCB0446], H358 [ATCC® CRL-5807™], HCC827 [ATCC® CRL-2868™], MKN-45 [DSMZ ACC 409] N87 [ATCC®CRL-5822™] and A431 [ATCC® CRL-1555™], их постоянно поддерживали в питательной среде с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (ФБС (FBS)). Клетки Hek293f Freestyle были получены из Invitrogen и их постоянно поддерживали в среде 293 FreeStyle.

Конструкции кДНК:

Создание векторов экспрессии cMET и EGFR для получения стабильных клеточных линий (cMET и EGFR) и для иммунизации (cMET)

Полноразмерную кДНК каждой мишени, включая уникальные рестрикционные сайты для клонирования и консенсусную последовательность Козака для эффективной трансляции, либо синтезировали, либо получали путем ПЦР-амплификации на коммерчески доступной экспрессионной конструкции, содержащей целевую кДНК, со специфичными праймерами, посредством которых вводили уникальные рестрикционные сайты для клонирования и консенсусную последовательность Козака для эффективной трансляции. Полноразмерную кДНК каждой мишени клонировали в эукариотическую экспрессионную конструкцию, такую как pcDNA3. 1, тогда как внеклеточные домены клонировали в pVAX1 и pDisplay. Введенные последовательности проверяли путем сравнения с референсными аминокислотными последовательностями базы NCBI.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки EGFR человека для экспрессии на поверхности клетки (идентично GenBank: NP_00533):

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGT SNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFN NCEVVLGNLEIT
YVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPL ENLQII RGNMY YENS YALAVLSNYDANKTGLKELP
MRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMD FQNH LGSCQKCDPSPNGSCWGAGE
ENCQKLTKII CAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNP
TTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVT DHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGI
GIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ
AWPENRTDLHAFENLEII RGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVII SGKNLCYANTIN
WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRCV D K C N L L E G
EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYAD
AGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG CPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTL R
RLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELR
EATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRL LGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLN
WCVQIAKGMNYLED RRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAE EKEYHAEGGKVPIKWMAL E
SILHRIYTHQSDVWSYGVT VWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWM
IDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSP TDSNFYRALMDEEDMDDVDADEYLIPQ
QGFFSSPSTSRTPLLSSL SATSN NSTVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLP
VPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPA H
WAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGI FKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

В которой:

– MRPSGTAGAALLALLAALCPASR: сигнальный пептид.

– ALEEKVKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEV
AGYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNN
5 PALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSG
RCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGA
TCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK
HFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEI
10 IRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISN
RGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPE
CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT
GPGLEGCPNGPKIPS: ECD EGFR человека.

– IATGMVGALLLLLVALGIGLFM: прогнозируемая ТМ область.

– RRRHIVRKRTLRLQLERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGL
15 WIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCL
LDYVREHKDNIGSQYLLNWCQVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKITDFGLAKLLGAE
KEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLP
QPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALM
DEEDMDDVDADADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLSSLATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRY
20 SDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEY
LNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSQISLDNPDYQQDFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSE
FIGA: внеклеточный хвост.

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена EGFRvarIII человека
25 представляет собой природный вариант EGFR VAR_066493 [Ji H., Zhao X; PNAS
103: 7817-7822(2006)], вызванный делецией экзонов 2-7 внутри рамки считывания.
"_" ниже указывает на расположение недостающих аминокислот 30-297

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKK_GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCR
30 KVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEIT
GFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLC
YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDK
CNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTL
VWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

35 В которой:

– MRPSGTAGAALLALLAALCPASR: сигнальный пептид.

– ALEEKK_GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSI
NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA
40 FENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSEC
IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN
CTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS: ECD EGFRvarIII

45 Химерная аминокислотная последовательность: внеклеточный домен EGFR макака
(Macaca mulatta), гибридный с трансмембранным и внутриклеточным
доменом EGFR человека для экспрессии на поверхности клетки (идентично

GenBank: XP_014988922.1. Последовательность EGFR человека подчеркнута в примере ниже.

5 MGPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQ
YVQ RNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPILENLQIIIRGNMYEYENSALAVLSNYDANKTGLKELP
MRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE
ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNP
TTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGI
10 GIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ
AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTIN
WKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNILEG
EPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYAD
AGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPSIATGMLGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTL
RLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELR
15 EATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLN
WCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPKWMAL
SILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
IDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPDTSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPQ
QGFFSSPSTSRTPLLSSLATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLP
20 VPEYINQSVPKRPAQSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPA
HWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

В которой:

– MGPSGTAGAALLALLAALCPASR: сигнальный пептид.
25 – LEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQ RNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPILENLQIIIRGNMYEYENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNLLEGEPEREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS: ECD cyEGFR
30
35

Вставка полноразмерной аминокислотной последовательности cMET человека для экспрессии на поверхности клетки (идентична GenBank: P08581-2).

Последовательность отличается от референсной последовательности вставкой в положении 755-755: S → STWWKEPLNIVSFLFCFAS

40 MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRLKETKDGFMLTDQSYIDVLPFEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQAQTFHTRIIRFCSINSGLSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNIQAAAYVSKPGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVRCLOHFYGPNEHCENRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLD SHPVSPREVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDK

CVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTL
 TLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLTTLTGN
 YLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIH
 PTKSFISTWWKEPLNIVSFLFCFASGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSSEI
 5 ICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKEKPMISMGNENVLEIKGNDID
 PEAVKGEVLKVGNGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSSTVLGKVIVQPDQNFGL
 IAGVVSISTALLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVD
 YRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVV
 IGPSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPN
 10 VLSLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLA
 ARNCMLDEKFTVKVADFGGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLW
 ELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIIFS
 TFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS

15 В которой:

– MКАPAVLAPGILVLLFTLVQRSNG: сигнальный пептид

– ЕСКЕАLAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVLHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKT
 GPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADI
 QSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHSISVRRLKET
 20 KDGFMFLTDQSYIDVLPFEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHTRIIRFCSINSGLHS
 YMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNIQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPM
 RSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVRCQLHFYGNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQR
 VDLEFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPVIVEH
 TLNQNQYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICL
 25 PAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAM
 NKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLTTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCT
 LKSVNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKN
 LNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLI
 YVHNPVFKPFKEKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLK

30 LNSELNIEWKQAISSSTVLGKVIVQPDQNF: ECD cMET человека

– GLIAGVVSISTALLLLGFFLWL: трансмембранная область

– KKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQ
 NGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVVIGPSLIVHFNEVIG
 RGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGS
 35 LVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVAD
 FGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTF
 DITVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAI FSTFIGEHYVHV NATYVNV
 VKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS: внутриклеточная область

40 *Референсные антитела*

Антитела к cMET известны в данной области техники (Таблица 1).

Моноспецифичные двухвалентные антитела к cMET конструировали в соответствии с опубликованной информацией и экспрессировали в клетке 293f Freestyle. В Таблице 1 представлена соответствующая раскрытая информация.

45 Моноспецифичные бивалентные антитела, направленные против cMET, конструировали в соответствии с опубликованной информацией и экспрессировали в клетках 293F Freestyle. Для анализов блокирования лиганда HGF кодирующие VH

и VL генные сегменты антител к cMET, полученных на основе патентованных антител, повторно клонировали в вектор для фагового дисплея для дисплея на нитевидном бактериофаге.

5 Референсное антитело цетуксимаб (Эрбитукс) применяли в качестве референсного антитела для панели EGFR Fab.

Белок 2994 Fab создавали из очищенной PG2994 IgG, при помощи гидролиза папаином. Таким образом, PG2994 инкубировали с папаином, связанным с гранулами (Pierce #44985), и гидролизировали в течение 5,5 часов при 37°C при покачивании. Фрагменты Fab были очищены из гидролизной смеси путем
10 фильтрации через MabSelectSure LX. Прошедшие фильтрацию фракции, содержащие белок Fab, концентрировали до 3 мл с использованием vivaspin20 10 kDa и далее очищали гель-фильтрацией с использованием колонки superdex75 16/600 в фосфатно-солевом буфере ФСБ (PBS).

15 **Пример 2**

Получение бивалентных моноклональных антител и характеристика антител

Гены VH уникальных антител, судя по последовательности VH гена и некоторых вариантов его последовательности, клонировали в вектор с остовом IgG1. Суспензию адаптированных клеток 293f Freestyle культивировали в колбах T125 на платформе шейкера до плотности $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки высевали с
20 плотностью $0,3-0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета. Клетки временно трансфицировали с помощью индивидуальной стерильной смеси ДНК: PEI и далее культивировали. Через семь дней после трансфекции супернатант собирали, фильтровали через 0,22 мкм (Sartorius) и
25 очищали на гранулах белка A (protein A beads) при помощи установки периодического действия с последующей заменой буфера на ФСБ (PBS).

Ингибирование EGF-опосредованного апоптоза

Высокие (10 нМ) концентрации EGF индуцируют (апоптотическую) гибель
30 клеток в клетках A431 [Gulli et al., 1996]. Этот эффект может быть дозозависимо отменен добавлением лиганд-блокирующих антител к EGFR, таких как цетуксимаб.

Чтобы проверить бивалентные антитела IgG к EGFR на их способность ингибировать EGF-индуцированную гибель клеток A431, антитела инкубировали в серийных разведениях - от 10 мкг/мл и далее - в присутствии 10 нМ EGF. Каждый
35 тестовый планшет содержал серийное разведение отрицательного (Ctrl Ab; PG2708) и положительного контрольного антитела (цетуксимаб), которые служили референсными контролями. На третий день добавляли аламаровый синий (Invitrogen, # DAL1100) (20 мкл на лунку) и измеряли флуоресценцию после 6 часов инкубации (при 37°C) с аламаровым синим с использованием возбуждения 560 нм и
40 считывания 590 нм на многорежимном считывающем устройстве для микропланшетов Biotek Synergy 2. На Фигуре 2 показана активность антител cLC к EGFR по сравнению с цетуксимабом и контрольным антителом. Антитела PG4280, 3755 и 3752 были более эффективны по сравнению с цетуксимабом, тогда как антитела PG4281 и PG3370 показали меньшую эффективность.

45

Блокирующий EGF вариант ИФА

Специфичные к EGFR фаги тестировали на связывание с рекомбинантным EGFR в отсутствие и присутствии молярного избытка лиганда (EGF). Таким образом, 5 мкг/мл антитела козы против антитела IgG человека наносили на планшеты для ИФА MAXISORP™ и оставляли на ночь при температуре 4°C. Лунки планшето-
 5 планшето- для ИФА блокировали ФСБ (PBS) (pH 7,2), содержащим 2% ELK, в течение 1 ч при комнатной температуре при покачивании (700 rpm). Затем 5 мкг/мл рекомбинантного EGFR-Fc человека инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Между тем, IgG в серийном разведении смешивали с биотинилированным EGF человека в течение одного часа при комнатной
 10 температуре. После отмывания несвязанного EGFR-Fc человека добавляли смесь антитела/EGF и позволяли ей связываться в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанный EGF выявляли HRP-стрептавидином в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве контроля процедуру проводили одновременно с антителом, специфичным к антигенам в покрытии (не показано), и отрицательным
 15 контрольным фагом (Neg Ctrl Ab). Связанное вторичное антитело визуализировали при помощи окрашивания ТМБ/Н₂О₂, и количественно определяли с помощью измерения оптической плотности ОП (OD) при 450 нм. На Фигуре 11 показано, что антитело PG3370, которое менее эффективно в ингибировании EGF-опосредованного апоптоза, проявляет аналогичную EGF-блокирующую активность по сравнению с цетуксимабом.
 20

Тест на перекрестную реактивность EGFR яванского макака и EGFR мыши

Чтобы проверить, были ли IgG к EGFR реактивны с EGFR яванского макака, конструкции, кодирующие полноразмерный EGFR человека, а также
 25 экспрессионную конструкцию, кодирующую ECD яванского макака, слитую с внутриклеточным EGFR человека, трансфицировали в (антиген-отрицательные) клетки CHO, а затем клетки окрашивали анти-EGFR антителами при 5 мкг/мл и, наконец, анализировали при помощи FACS. В качестве положительного контроля для окрашивания применяли клинически применяемое антитело цетуксимаб, так
 30 как это антитело, как известно, перекрестно реагирует с EGFR яванского макака. Было показано, что PG3370, PG3752, PG4280 и PG4281 реагируют с EGFR яванского макака, поскольку окрашивание клеток, экспрессирующих EGFR человека, было практически неотличимо от окрашивания клеток, экспрессирующих химерный рецептор (Фигура 12).

35 Чтобы проверить IgG к EGFR на их перекрестную реактивность с EGFR мыши, проводили ИФА. Рекомбинантный EGFR ECD-Fc мыши, серийно разведенный, начиная с 5 мкг/мл и разбавленный до 0,038 мкг/мл, наносили на планшеты ИФА MAXISORP™ и оставляли на ночь при 4°C. Связывание IgG к EGFR с этим антигеном испытывали при фиксированной концентрации 5 мкг/мл и позволяли
 40 связываться в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве положительного контроля иммунореактивности антител был проведен ИФА с теми же установками с использованием слитого белка EGFR ECD-Fc человека в качестве антигена (R&D systems). Затем добавляли конъюгат антитела козы против IgG мыши с HRP (BD Biosciences) и обеспечивали связывание в течение 2 часов при комнатной
 45 температуре. Связанный IgG выявляли посредством измерения ОП (OD) при 450 нм. Было показано, что антитело PG3370 распознает EGFR мыши, а также EGFR

человека с аналогичной аффинностью (Фигура 13 - верхняя панель). Цетуксимаб не распознает EGFR мыши (125084 Erbitux Pharmacology Review Part 2-FDA). Таким образом, PG3370 и цетуксимаб не распознают один и тот же эпитоп на EGFR человека.

5

Тест на перекрестную реактивность сMET мыши

Чтобы проверить PG3342 на его перекрестную реактивность с сMET мыши, проводили ИФА. Фиксированную концентрацию HGF R/c-MET Fc мыши (R&D systems) HGF R/c-MET Fc разбавляли до 2,5 мкг/мл в ФСБ (PBS) и наносили на планшеты для ИФА MAXISORPTM на ночь при 4°C. Связывание IgG к сMET с этим антигеном тестировали в полулогарифмическом разведении, начиная с 10 мкг/мл. Обеспечивали связывание антител в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве положительного контроля иммунореактивности антител проводили ИФА с теми же установками с использованием слитого белка человека HGF R/c-MET Fc в качестве антигена (R&D systems). Затем добавляли конъюгат антитела козы против IgG мыши с HRP (BD Biosciences) и обеспечивали связывание в течение 2 часов при комнатной температуре. Связанный IgG выявляли посредством измерения ОП (OD) при 450 нм. BAF527 - афинно очищенное от антигена поликлональное антителю IgG козы, направленное против сMET мыши, связанное с биотином, включали в качестве положительного контрольного антитела. Не наблюдали никакой перекрестной реактивности антитела PG3342 с сMET мыши (Фигура 13, нижняя панель).

10

15

20

Анализ перекрестного блокирования антител к сМЕТ

Специфичные для сМЕТ фаги тестировали на конкуренцию с референсными антителами к сМЕТ в ИФА. Таким образом, 2,5 мкг/мл слитого белка сМЕТ-Fc наносили на планшеты для ИФА MAXISORPTM и оставляли на ночь при 4°C.

- 5 Лунки планшетов для ИФА блокировали ФСБ (PBS) (рН 7,2), содержащим 2% ELK, в течение 1 ч при комнатной температуре при покачивании (700rpm). Затем добавляли референсный или отрицательный контрольный IgG в концентрации 5 мкг/мл и позволяли связываться в течение 15 мин при комнатной температуре при 700rpm. Затем добавляли 5 мкл фага, осажденного ПЭГ (PEG), и давали ему
- 10 возможность связываться в течение 1 ч при комнатной температуре при 700rpm. Связанные фаги выявляли антителом против M13, меченым HRP, в течение 1 ч при комнатной температуре при 700rpm. В качестве контроля процедуру проводили одновременно с антителом, специфичным для антигенов в покрытии, и отрицательным контрольным фагом. Связанное вторичное антитело
- 15 визуализировали при помощи окрашивания ТМВ/Н₂О₂, окрашивание количественно определяли с помощью измерения оптической плотности ОП (OD)при 450нм. Таблица 2 показывает, что MF4040 и MF4356 конкурируют с референсным антителом 5D5. MF4297 конкурирует с 13.3.2 и в меньшей степени с C8H241. Все фаги положительного контроля демонстрируют полную конкуренцию с
- 20 соответствующим IgG, тогда как контроль без антител не влияет на анализ конкуренции.

Получение биспецифичных антител

- 25 Биспецифичные антитела получали путем временной котрансфекции двумя плазмидами, кодирующими IgG с различными доменами VH, с использованием собственной технологии конструирования СНЗ для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифичных антител. Общую легкая цепь также ко-трансфицировали в ту же самую клетку, либо на той же самой плазмиде, либо на другой плазмиде. В параллельно находящихся на рассмотрении заявках
- 30 (например, WO2013/157954 и WO2013/157953; включены в данную заявку путем ссылки) авторы изобретения раскрыли способы и средства для получения биспецифичных антител из одной клетки, в результате чего обеспечены средства, способствующие образованию биспецифичных антител, а не образованию моноспецифичных антител. Эти способы также могут быть эффективно применены
- 35 в настоящем изобретении. В частности, предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифичных полноразмерных молекул IgG являются замены аминокислот в положениях 351 и 366, например L351K и T366K (нумерация в соответствии с нумерацией ЕС) в первом домене СНЗ (тяжелая цепь "KK-вариант") и замены аминокислот в положениях 351 и 368, например L351D и
- 40 10 L368E во втором домене СНЗ (тяжелая цепь "DE-вариант"), или наоборот. Ранее в параллельно находящихся на рассмотрении заявках авторов изобретения было показано, что отрицательно заряженная тяжелая цепь, представляющая собой DE вариант и положительно заряженная KK - вариантная тяжелая цепь предпочтительно спариваются, образуя гетеродимеры (так называемые 'DEKK'
- 45 биспецифичные молекулы). Гомодимеризация DE-вариантных тяжелых цепей (DE-DE гомодимеры) или KK-вариантных тяжелых цепей (KK-KK гомодимеры) не

приветствуется из-за сильного отталкивания между заряженными остатками в области связывания (интерфейсе) CH3-CH3 между идентичными тяжелыми цепями.

Fab-плечи к cMET и EGFR клонировали в соответствующие векторы KK и DE (Таблица 3). После получения, биспецифичное антитело класса IgG очищали путем периодической очистки (batch purification) с белком А, и буфер заменяли на ФСБ (PBS). В результате успешной продукции получали полноразмерное антитело IgG1 с минимальной концентрацией 0,1 мг/мл, которому присваивали уникальный код (PBnnnnn; где nnnnn представляет случайно сгенерированное число) для идентификации специфичной комбинации 2 различных связывающих мишень фрагментов Fab. Успешно полученные биспецифичные IgG тестировали на связывание с их соответствующими мишенями в ИФА.

Пример 3

Скрининг биспецифичных антител к c-MET x EGFR в тесте пролиферации EGF/HGF и HGF и EGF

Эффективность панели биспецифичных антител к cMET x EGFR тестировали в клетках N87 с применением HGF/EGF, HGF и EGF-анализов. Клеточная линия N87, официальное название NCI-N87, представляет собой клеточную линию карциномы желудка, полученную из области метастазирования и имеющую высокие уровни экспрессии EGFR и средние уровни экспрессии cMET (Zhang et al, 2010). Антитела тестировали в 8-ступенчатом полулогарифмическом разведении в диапазоне от 10 мкг/мл до 3,16 нг/мл. Каждое антитело тестировали в двух повторениях. В качестве отрицательного контроля применяли антитело против RSV-G PG2708. референсное антитело 2994 Fab применяли в качестве положительного контроля для анализа HGF, а референсное антитело цетуксимаб применяли в качестве положительного контроля для EGF.

Эквимольную смесь 1:1 цетуксимаб/5d5 Fab применяли в качестве положительного контроля для анализа EGF, HGF и EGF/HGF.

Для определения окна анализа включали лунки с одним или комбинацией лигандов, а также контрольные среды. Антитела разводили в минимальной среде с определенным химическим составом (CDS: Среда RPMI1640, содержащая 80Ед пенициллина и 80 мкг стрептомицина на мл, 0,05% (м./об.) BSA и 10 мкг/мл Голотрансферрина), также добавляли 50 мкл разбавленного антитела в лунки 96-луночного планшета черного цвета с прозрачным дном (Costar). Добавляли лиганд (50 мкл на лунку исходного раствора, содержащего 400 нг/мл HGF и 4 нг/мл EGF, и EGF/HGF в концентрации 4 нг/мл EGF/400 нг/мл HGF, разведенный в CDS: R&D systems, кат.номер 396-HB и 236-EG). Клетки N87 трипсинизировали, собирали и подсчитывали, и 8000 клеток в 100 мкл CDS добавляли в каждую лунку планшета. Чтобы избежать краевых эффектов, планшеты оставляли на час при комнатной температуре, а затем помещали в контейнер внутри инкубатора для культивирования клеток при температуре 37°C на три дня. На четвертый день добавляли аламаровый синий (Invitrogen, # DAL1100) (20 мкл на лунку) и измеряли флуоресценцию после 6 часов инкубации (при 37°C) с аламаровым синим с использованием возбуждения при 560 Нм и считывания при 590 Нм на

многорежимном устройстве для считывания микропланшетов Biotek Synergy 2. Значения флуоресценции нормализовали по уровню неингибированного роста (антитела отсутствуют, но добавлены оба лиганда). Пример анализа пролиферации HGF, EGF и EGF/HGF показан на Фигуре 14 (Фигура 14А, В и С соответственно).

5

В Таблице 4 приведены результаты различных экспериментов. В анализе N87 HGF/EGF идентифицировали четырнадцать различных биспецифичных молекул к сMETxEGFR с эффективностью, сопоставимой с референсными моноспецифичными антителами (эквимоллярная смесь цетуксимаба и 5d5 Fab): PB7679, PB7686, PB8218, PB8244, PB8292, PB8316, PB8340, PB8364, PB8388, PB8511, PB8535, PB8583, PB8607 и PB8640.

10

В анализе EGF N87 идентифицировали одиннадцать различных биспецифичных молекул к сMETxEGFR с эффективностью, сравнимой с моноспецифичным цетуксимабом: PB7679, PB8244, PB8292, PB8340, PB8364, PB8388, PB8511, PB8535, PB8583, PB8607 и PB8640. Все они содержат Fab-плечо EGFR MF3755. В анализе HGF N87 идентифицировали девять биспецифичных молекул, которые показали более высокую эффективность по сравнению с моноспецифичным референсным антителом 5D5 Fab: PB8218, PB8388, PB8511, PB8532, PB8535, PB8545, PB8583, PB8639 и PB8640. Они содержат шесть различных Fab-плеч к сMET MF4040, MF4297, MF4301, MF4356, MF4491 и MF4506.

15

20

Активность АЗКЦ (ADCC)

25

Активность в отношении АЗКЦ 24-х биспецифичных молекул к сMetxEGFR тестировали на линиях опухолевых клеток N87 (EGFR-high, сMET-low) и MKN-45 (EGFR-low, сMET-amplified). Анализ АЗКЦ (ADCC) проводили с использованием набора Promega ADCC Bioassay kit в формате 384-луночного планшета. Антитела тестировали в двух повторениях в 9 различных концентрациях в полулогарифмических серийных разведениях в диапазоне от 10 мкг/мл до 1 нг/мл.

30

Референсное антитело цетуксимаб включали в качестве положительного контроля для анализа, а PG2708 применяли в качестве отрицательного контрольного антитела. Антитела или контрольную среду анализа (без IgG) инкубировали в течение 6 часов индукции при 37°C с эффекторными клетками АЗКЦ (ADCC) и клетками-мишенями (N87 или MKN-45). Активность люциферазы определяли количественно с помощью люциферазного реагента Bio-Glo.

35

Пример анализа АЗКЦ (ADCC) показан на Фигуре 15. Ни одна из биспецифичных молекул сMETxEGFR не показала значительной активности АЗКЦ (ADCC) в обеих клеточных линиях. Положительное контрольное референсное антитело цетуксимаб показало зависимую от дозы активность АЗКЦ (ADCC) в обеих клеточных линиях.

40

Пять биспецифичных молекул, состоящих из плеч к EGFR и сMet, которые показали высокую эффективность в анализе HGF/EGF N87 и показали высокое разнообразие последовательностей (Таблица 5), были отобраны для дальнейшего анализа. Две из пяти биспецифичных молекул содержат MF4356, который конкурирует с 5D5 за связывание с сMET (Таблица 2). В Таблице 5 приведены характеристики отобранных кандидатов.

45

Анализ миграции ранозаживляющих клеток

Две клеточные линии NSCLC тестировали в анализе заживления ран; EBC-1 и H358. Эти клеточные линии были выбраны, поскольку они экспрессируют высокие уровни EGFR и c-Met (Zhang et al, 2010; Fong et al., 2013). Анализ проводили посредством анализа заживления ран на 24-луночной планшете CytoSelect™ (Cell Biolabs, CBA-120) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, $2,5 \cdot 10^5$ раковых клеток высевали в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при 37°C с образованием монослоя. Содержимое лунок затем удаляли, чтобы создать раневое поле 0,9 мм. После промывания ФСБ (PBS) для удаления мертвых клеток и клеточного дебриса в области раны клетки инкубировали в течение 15 минут при 37°C с полной средой (0,5% ФСБ (FBS)), содержащей биспецифичные молекулы (100 нм) или контрольную смесь антител цетуксимаб:Fab2994 (100 нм, молярное соотношение 1:1). Затем в каждую лунку добавляли факторы роста: HGF (15 нг/мл), EGF (12,5 нг/мл), или их комбинацию (15 и 12,5 нг/мл). Периодическое наблюдение за закрытием раны проводили в течение 14 ч при 37 °C с помощью конфокального микроскопа (Zeiss LSM780). Степень (%) закрытия раны показана относительно контролей без обработки.

Было показано увеличение миграции (процент закрытия раны) клеток H358 при воздействии HGF либо EGF, что было наиболее эффективно при комбинации HGF и EGF (Фигура 3). Указанную увеличенную миграцию нейтрализовали добавлением большинства биспецифичных молекул, при этом она была наиболее выраженной при использовании PB8532. Это ингибирование было сопоставимо с комбинацией цетуксимаба и 5d5 Fab, за исключением миграции ингибирования в присутствии EGF/HGF.

Было показано небольшое увеличение миграции клеток EBC-1 при добавлении HGF; и отсутствие увеличения миграции в присутствии EGF или комбинации EGF/HGF. Однако закрытие раны может быть ингибировано во всех условиях анализа биспецифичными молекулами, в частности PB8532. PB8532 был столь же эффективным или более эффективен (EGF/HGF), чем комбинация цетуксимаб/5D5 Fab.

Анализ экспрессии EGFR и cMET в клетках PC-9 и HCC827 методом проточной цитометрии

Приобретенная устойчивость к эрлотинибу может быть результатом aberrантной активации опосредованной HGF активации c-MET. Клеточные линии NSCLC PC-9 и HCC827 выбрали для изучения способности биспецифичных антител cMETxEGFR ингибировать лиганд-опосредованную пролиферацию в условиях резистентности к ингибитору тирозинкиназы (TKI). Обе клеточные линии не содержат мутаций EGFR и устойчивы в присутствии HGF как к эрлотинибу, так и к гефитинибу или комбинации гефинитиба и эрлотиниба (только PC-9). Известно, что в клетках PC-9 индуцированная HGF резистентность к эрлотинибу может быть заблокирована ингибитором cMET (Nakade et al., 2014), и резистентность к гефитинибу может быть заблокирована антителом против HGF (Yano, 2008). PC-9 и HCC827 охарактеризовывали на предмет экспрессии cMET и EGFR при помощи анализа FACS с применением флуоресцентно меченых антител. Клетки собирали с

ФСБ (PBS) с 2 мМ ЭДТА (EDTA). Суспензии одиночных клеток (10^6 клеток в 50 мкл) инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами на льду в течение 20 мин в красящем буфере (ФСБ (PBS) 2% ФБС (FBS) 2 мМ ЭДТА (EDTA)). Следующие антитела применяли отдельно или в комбинации: Конъюгат Met Alexa Fluor 488 (D1C2 клон, Cell Signaling, разведении 1:50); конъюгат Рецептора EGF Alexa Fluor 647 (D38B1 клон, Cell Signaling, разведении 1:50). После инкубации клетки промывали красящим буфером и проводили анализ FACS на проточном цитометре BD FACSVerse.

Все клетки HCC827 экспрессируют EGFR и могут быть подразделены на EGFR^{high}, cMET^{pos} популяцию и EGFR^{pos}, cMET^{neg} популяцию (Фигура 4). Клетки PC-9 содержат небольшую популяцию клеток EGFR^{high} и cMET^{pos} и минимальную популяцию клеток EGFR^{pos} и cMET^{neg}.

Анализ пролиферации PC-9 и HCC827

Начальные эксперименты проводили для определения концентрации HGF, приводящей к устойчивости к эрлотинибу и gefitinibu в клетках PC-9 и HCC827. После выращивания клеток в течение ночи в минимальной среде, содержащей 0,5% ФБС (FBS), клетки инкубировали при повышении концентрации HGF, изменяющейся от 0 до 120 нг/мл, дополненной 300 нМ эрлотиниба или gefitiniba в 10% ФБС (FBS). После 72 часов инкубации пролиферацию клеток оценивали с помощью реагента WST-1 в соответствии с инструкциями производителя. Поглощение измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов при экспериментальной и референсной длинах волн 450 и 630 нм соответственно. Как в случае PC-9 (Фигура 16A), так и в случае HCC287 (Фигура 16B) добавление HGF индуцировало устойчивость к TKI в зависимости от дозы.

Эффективность PB8532 и PB8388 тестировали в условиях резистентности к TKI. 4×10^3 раковых клеток были высеваны на 96-луночные планшеты в 100 мкл полной RPMI 1640 (10% ФБС (FBS)). После выращивания клеток в течение ночи в минимальной среде, содержащей 0,5% ФБС (FBS), клетки предварительно инкубировали в течение 15 минут при 37°C с Biclomics® (100 нМ) или контрольной смесью моноспецифичных антител цетуксимаб:Fab2994 (100 нМ, молярное соотношение 1:1). Каждую лунку затем дополняли полной средой (10% ФБС (FBS)), содержащей gefitinib или эрлотиниб (300 нМ) с или без HGF (30 нг/мл), EGF (30 нг/мл) или комбинацией обоих (в концентрации 30 нг/мл). После 72 часов инкубации пролиферацию клеток оценивали по методу WST-1.

На Фигуре 5 показано, что PB8532 может ингибировать HGF-опосредованную и EGF-опосредованную резистентность к gefitinibu в клетках PC-9. В клетках HCC827 PB8532 ингибировал опосредованную HGF резистентность к TKI и был более эффективным, чем введение комбинации двойного моноспецифичного цетуксимаба 5D5 Fab. Сопоставимые результаты были получены при применении в качестве TKI эрлотиниба.

Пример 4 ингибирование антителом PB8532 фосфорилирования EGF и cMET

После выращивания клеток в течение ночи в минимальной среде без ФБС (FBS) клетки инкубировали в течение 15 минут при 37°C в среде (0,5% ФБС (FBS)), содержащей PB8532 (100 нМ) или контрольную моноспецифичную смесь антител (100 нМ, молярное соотношение 1:1). Затем клетки стимулировали факторами роста: HGF (30 нг/мл) или EGF (50 нг/мл) в течение 15 минут при 37°C. После стимуляции клетки промывали ФБС (PBS) в присутствии 1 мМ ортованадата (Sigma-Aldrich). Экстракцию белка проводили с использованием лизирующего буфера RIPA (50 мМ Трис-HCl pH 8, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия ДСН (SDS)), дополненного полным коктейлем ингибиторов протеаз (Complete Protease Inhibitor Cocktail) (Roche), ингибитором фосфатазы PhosSTOP (Roche) и ортованадатом (1 мМ, Sigma-Aldrich). Лизаты инкубировали на льду в течение 30 минут перед центрифугированием в течение 15 минут при 4°C для удаления продуктов клеточного распада. После центрифугирования супернатант собирали и определяли концентрацию белка с помощью реагента бицинхониновой кислоты (BCA) (Pierce) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы белков денатурировали добавлением 6X загрузочного буфера (β-меркаптоэтанол 0,6 М; ДСН (SDS) 8%; Трис-HCl 0,25 М pH 6,8; глицерин 40%; Бромфенол синий 0,2%) и инкубировали при 95°C в течение 5 минут. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью блоттинг-системы Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad). Мембраны блокировали от неспецифического связывания в 5% нежирном сухом молоке в трис-буферном солевом растворе 0,1% (50 мМ Трис-HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин; TBS-T) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (ON) при 4° С. Применяли следующие первичные антитела к мишеням: Фосфо-Met (Tyr1234/1235, клон D26, Cell Signaling) 1:500 в TBS-T 5% BSA; Met (клон D1C2, Cell Signaling) 1:1000 в TBS-T 5% BSA; Рецептор Фосфо-EGF (Tyr1068, клон D7A5, Cell Signaling) 1:1000 в TBS-T 5% нежирного сухого молока; Рецептор EGF (клон D38B1, Cell Signaling) 1:1000 в TBS-T 5% BSA; Винкулин (моноклональное антитело к винкулину, V9131, SIGMA Aldrich) 1:4000 в TBS-T 5% нежирного сухого молока. После инкубации с указанными первичными антителами мембраны промывали в течение 15 мин в TBS-T и инкубировали с вторичными антителами (1:5000 в TBS-T 5% нежирном сухом молоке) в течение 1 ч при комнатной температуре. Применяли следующие вторичные антитела: антитело козы против IgG кролика с HRP (sc-2004, Santa Cruz biotechnology); антитело козы против IgG мыши с HRP (sc-2005, Santa Cruz biotechnology). Сигнал визуализировали с помощью Реагентов для Усиленной Хемилюминесценции (ECL; Invitrogen) или Хемилюминисцентного Субстрата SuperSignal West Femto (Thermo Scientific) с цифровым визуализатором (ImageQuant LAS 4000, GE Health Care Life Science Technologies).

На Фигуре 6 показан Вестерн-Блот-анализ выполненного эксперимента.

В клетках PC-9 PB8532 и 5D5/цетуксимаб были способны снижать индуцированное HGF фосфорилирование. Кроме того, оба антитела незначительно снижали фосфорилирование EGF в отсутствие и присутствии EGF.

В клетках HCC827 PB8532 снижалось фосфорилирование сМЕТ в присутствии и отсутствии HGF. Никакого эффекта не наблюдали при комбинации 5D5/цетуксимаб. Кроме того, в этой клеточной линии PB8532 снижало EGF-индуцированное фосфорилирование EGFR в отличие от комбинации 5D5 с цетуксимабом.

Пример 5

На Фигуре 7 показаны различные последовательности для альтернативных переменных областей тяжелой цепи переменного домена, связывающего EGFR, согласно настоящей заявке. На Фигуре 8 показаны различные последовательности для альтернативных переменных областей тяжелой цепи переменного домена, связывающего сМЕТ, согласно настоящей заявке. Переменные области тяжелой цепи применяли для создания ряда различных биспецифичных антител к сМЕТ и EGFR. Легкая цепь в этих антителах имеет последовательность, показанную на Фигуре 9В. Биспецифичные антитела получали, как описано в Примере 1. Также получали версию антител с повышенной АЗКЦ (ADCC). Версии с повышенной АЗКЦ (ADCC) получали путем включения при котрансфекции конструкциями антител ДНК, кодирующей фермент редуктазу, которая удаляет остаток фукозы из Fc-области IgG1.

На Фигуре 17 показано разведение различных полученных биспецифичных антител на клетках EGFR CHO-K1, описанных в Примере 2 (Панель А), и на клетках MKN-45, эндогенно экспрессирующих с-МЕТ (Панель В). Клетки инкубировали в количестве 2×10^5 клеток/луночка с увеличением концентрации антител, как указано. После промывания выявляли связывание с IgG-РЕ человека (3 мкг/мл). Окрашенные клетки анализировали на системе iQue и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и площадь под кривой (AUC). Контрольными антителами были MF1337хMF1337 (PG1337p218; TTхTT отрицательный контроль; темные треугольники внизу) и MF4356хMF3770 (PB8532p04; с-МЕТхEGFR положительный контроль; черные треугольники). TT означает столбчатый анатоксин. Переменный домен, содержащий VH MF1337 (см. Фигуру 1) и общую легкую цепь, в соответствии с данным изобретением, связывается со столбчатым анатоксином и, таким образом, не ожидается связывания с клетками EGFR CHO-K1 и клетками MKN-45. Примечание (АЗКЦ (ADCC)) указывает, что антитела получают с повышенной функцией АЗКЦ (ADCC) посредством котрансфекции с ДНК, кодирующей фермент RMD, чтобы удалить остаток фукозы из области Fc IgG1. Список применяемых биспецифичных антител и их PB-кодирование см. в Таблице 6.

Репортерный анализ АЗКЦ (ADCC)

Проводили репортерный анализ АЗКЦ (ADCC), чтобы определить, успешно ли котрансфекция ДНК, кодирующей RMD, повышает эффекторную функцию АЗКЦ (ADCC). Все образцы испытывали в двух повторениях на клетках ВхРСЗ (которые экспрессируют EGFR) и клетках MKN-45 (которые экспрессируют с-МЕТ), используя как анализ высокой аффинности, так и низкой. Высокоаффинные эффекторные клетки экспрессируют V-вариант FcγRIIIa человека, а низкоаффинные эффекторные клетки экспрессируют F-вариант.

Вкратце, клетки-мишени ВхРСЗ и МKN-45 собирали и высевали в количестве 1000 клеток/лунка в 30 мкл и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, 95% относительной влажности. На следующий день среду удаляли и 10 мкл разведенных антител добавляли в каждую лунку (разведение антител 1,5х; серийные разведения с 9 стадиями с полулогарифмическими разведениями, что приводило к концентрации в анализе от 1 нг/мл до 10 мкг/мл). В тот же день эффекторные клетки размораживали при 37°C, добавляли 630 мкл к 3,6 мл аналитического буфера в 15-мл пробирке и перемешивали переворачиванием; затем в лунки аналитического планшета добавляли 5 мкл этого раствора (15 000 клеток). Планшет инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂, 95% относительной влажности воздуха перед добавлением 15 мкл реагента Bio-Glo в аналитические лунки. Люминесценцию измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов EnVision.

Список протестированных образцов представлен в Таблице 6, а результаты анализов представлены на Фигуре 18. Контрольное антитело к HER3 x EGFR, без повышения АЗКЦ (ADCC) (серия PB4522p25; MF4280xMF3178, описанная в WO2015/130172), обеспечило отрицательный результат во всех четырех анализах (обозначено черными крестиками и сплошными линиями (4 Сверху) на Фигуре 18). Напротив, версия с повышенной АЗКЦ (ADCC) этого антитела (PB4522p34) обеспечила положительный результат во всех четырех анализах (обозначенных сплошными оранжевыми кругами). Аналогичным образом, контрольное антитело к C-MET X EGFR (PB8532p04), без повышения АЗКЦ (ADCC), обеспечило отрицательный результат во всех четырех анализах (обозначено черными крестиками и пунктирными линиями на Фигуре 18), и партия PB8532p05, также не имела повышенной АЗКЦ (ADCC) (обозначена зелеными звездочками). Три линии со звездочками находятся в нижней части четырех панелей. Однако вариант P06 с повышением АЗКЦ (ADCC) (PB8532p06) обеспечил положительный результат во всех анализах (обозначен незакрашенными оранжевыми кружочками). Повышенную эффекторную функцию АЗКЦ (ADCC), аналогичная функции PB8532p06, также отмечали для 5 биспецифичных молекул (PB19474-PB19478). Это означало, что котрансфекция ДНК, кодирующей RMD, успешно повышала эффекторную функцию АЗКЦ (ADCC).

Пример 6

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) вариабельного домена к cMET PB8532 содержит аминокислоту MF4356, как показано, например, на Фигуре 8. VH вариабельного домена к cMET PB19748 содержит аминокислотную последовательность MF8230 (см. Фигуру 8). VH вариабельного домена EGFR PB8532 содержит аминокислоту MF3370, как показано, например, на Фигуре 7. VH вариабельного домена к EGFR PB19748 содержит аминокислотную последовательность MF8233, показанную на Фигуре 7. Легкая цепь в PB8532 и PB19748 одинакова и показана на Фигуре 9B. Антитело к cMET LY2875358 описано среди других в Kim and Kim 2017. Способность биспецифичного антитела к

cMETxEGFR PB8532 или PB19748 ингибировать рост опухоли in vivo тестировали отдельно и в комбинации с ингибитором рецепторной тирозинкиназы эрлотинибом на модели ксенотрансплантата мыши. В выбранной модели опухолевые клетки HCC827 трансплантированы иммунодефицитным мышам NOD SCID gamma (NSG) с нокином (knock-in) фактора роста гепатоцитов человека (hHGFki), которые экспрессируют HGF человека (лиганд для cMET) вместо эндогенного HGF мыши. NSG-hHGFki мыши известны как NOD.Cg-Hgftm1.1(HGF)Aveo Prk^{dscid} Il2rgtm1Wjl/J (stk#014553) (NOD.Cg-Hgftm1.1(HGF)Aveo Prk^{dscid} Il2rgtm1Wjl/J). У них нет Т-или В-клеток, отсутствуют функциональные НК-клетки и недостаточен уровень цитокиновой сигнализации, что обеспечивает лучшее приживание опухоли. HCC827 представляет собой установленную клеточную линию немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) человека, которая экспрессирует EGFR и cMET и, как известно, резистентна к эрлотинибу в присутствии HGF.

Чтобы установить влияние эрлотиниба на рост опухоли в этой модели, провели первый эксперимент с двумя группами мышей. До трансплантации опухолевых клеток клеточный цикл клеток HCC827 ускоряли путем культивирования клеток в течение ночи в среде, дополненной 20% фетальной бычьей сывороткой ФБС (FBS) при конфлюэнтности, не превышающей 80%. На следующий день мышам линии NSG-hHGFki (The Jackson Laboratory) подкожно вводили 17x10⁶ опухолевых клеток HCC827, суспендированных в 300 мкл ФСБ (PBS) плюс 30% матригеля, содержащего высокую концентрацию матрикса базальной мембраны. Полученные опухоли измеряли дважды в неделю с помощью штангенциркуля. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 200 мм³, мышей случайным образом разделяли на две группы (по 4-7 мышей в каждой группе в зависимости от роста и объема опухоли) и начинали лекарственную терапию.

Свежую мелкодисперсную суспензию эрлотиниба готовили каждую неделю в 0,05% гидроксипропилметилцеллюлозе (HPMC) и 0,2% твин-80 в воде при помощи соникации.

Начиная с 19-го дня, раствор эрлотиниба применяли для введения мышам один раз в день (QD) через желудочный зонд в дозе 6 мг/кг (n=5), а группе из 4 мышей вводили один раз в день 200 мкл носителя (0,05% HPMC и 0,1% Tween 80 в воде) через желудочный зонд. Объем опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля, а средний объем опухоли (и SEM) рассчитывали для каждой группы. Когда размеры опухоли достигали 1500 мм³, мышей умерщвляли. Лечение прекращали после 48-го дня, а объем опухоли у выживших мышей измеряли до 62-го дня.

Во втором эксперименте, в котором проверяли способность биспецифичного антитела PB8532 ингибировать рост опухоли в этой модели (отдельно и в комбинации с эрлотинибом), мыши NSG-hHGFki с опухолями (генерируемыми, как описано выше) получали одно из шести лекарственных средств или комбинацию лекарственных средств, при этом антитела вводили еженедельно внутрибрюшинной (i.p.) инъекцией, а эрлотиниб или носитель вводили один раз в день (QD) через

желудочный зонд. В качестве отрицательного контроля мыши также получали PB17160, биспецифичное антитело, состоящее из того же Fab плеча к cMET, что и PB8532, в сочетании с Fab плечом, специфичным для нерелевантной мишени.

Нерелевантная мишень — это, например, мишень, которая отсутствует в мыши и опухоли. Часто применяют специфичный переменный домен к столбнячному анатоксину. Подходящий переменный домен связывания столбнячного анатоксина имеет VH MF1337 (см. Фигуру 1) и общую легкую цепь, согласно настоящей заявке, предпочтительно последовательность из Фигуры 9.

Биспецифичные антитела со связывающим мишень плечом и не связывающим мишень плечом (ГТ) среди прочих описаны в документе WO2017/069628, см. MF1337, который включен в данную заявку путем ссылки. Другой нерелевантной мишенью является RSV-G. Подходящий переменный домен к RSV-G имеет VH MF2708 с Фигуры 1 и общую легкую цепь, предпочтительно одну из показанных на Фигуре 9, предпочтительно 9B.

На 21 день, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 200 мм³, мышей случайно разделяли на шесть групп (5-7 мышей на группу в зависимости от роста и объема опухоли) и начинали лекарственную терапию: ежедневное введение только носителя через желудочный зонд (n = 5); еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB8532 плюс ежедневное введение носителя через желудочный зонд (n = 7); еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB17160 плюс ежедневное введение носителя через желудочный зонд (n = 6); ежедневное введение эрлотиниба через желудочный зонд 6 мг/кг (n = 7); еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB8532 плюс ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд (n = 7); или еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB17160 плюс ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд (n = 7). Как и прежде, объем опухоли контролировали и вычисляли средний объем опухоли (и SEM) в каждой группе. Все введения прекращали после 60-го дня, а объем опухоли у выживших мышей измеряли до 82-го дня.

В третьем эксперименте проверяли способность биспецифичного антитела PB19478 ингибировать рост опухоли в этой модели (отдельно и в комбинации с эрлотинибом). Мыши с опухолями NSG-hHGFki (генерируемыми, как описано выше) получали одно из шести лекарственных средств или комбинацию лекарственных средств, при этом антитела вводили еженедельно внутрибрюшинной (i.p.) инъекцией, а эрлотиниб или носитель вводили один раз в день (QD) через желудочный зонд.

На 23 день, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 200 мм³, мышей случайным образом разделяли на шесть групп (5-6 мышей в каждой группе в зависимости от роста опухоли и объема), и начинали лекарственную терапию: ежедневное введение только носителя через желудочный зонд (n = 5); еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB19478 плюс ежедневное введение носителя через желудочный зонд (n = 5); ежедневное введение эрлотиниба через желудочный зонд 6 мг/кг (n = 6); еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB19478 плюс ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд (n = 4, одна мышь умерла в процессе эксперимента); или еженедельные i.p. инъекции 25

мг/кг антитела LY2875358 плюс ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд ($n = 3$, одна мышь умерла в процессе эксперимента). Как и прежде, объем опухоли контролировали и вычисляли средний объем опухоли (и SEM) в каждой группе. Все введения прекращали после 93-го дня, а объем опухоли у выживших мышей измеряли до 93-го дня.

В четвертом эксперименте проверяли эффект более позднего введения PB19478. Мыши с опухолями NSG-hHGFki (генерируемыми, как описано выше) получали одно из двух лекарственных средств, при этом антитела вводили еженедельно внутривенной (i.p.) инъекцией, а эрлотиниб или носитель вводили один раз в день (QD) через желудочный зонд.

На 21-й день, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 200 мм³, всем 14 мышам начинали ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд. На 51-й день, когда средний объем опухоли явно превышал отметку 500 мм³, мышей случайным образом разделяли на две группы. Одной группе из шести мышей ежедневно вводили 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд, а группа из 8 мышей получала еженедельные i.p. инъекции 25 мг/кг антитела PB19478 плюс ежедневное введение 6 мг/кг эрлотиниба через желудочный зонд. Как и прежде, объем опухоли контролировали и вычисляли средний объем опухоли (и SEM) в каждой группе. Все введения прекращали после 72-го дня.

Результаты первого эксперимента показали, что эрлотиниб был способен индуцировать противоопухолевый ответ у мышей NSG-hHGFki, которым трансплантировали клетки HCC827, но только до тех пор, пока мыши получали лечение (Фигура 19). В периоде без приема препарата, который начался примерно через 4 недели лечения, объем опухоли явно увеличился у мышей, которые получали эрлотиниб.

Биспецифичное антитело PB8532 против cMETxEGFR также было способно индуцировать противоопухолевый ответ у мышей NSG-hHGFki, которым трансплантировали клетки HCC827 (Фигура 20). Этот эффект был больше, когда антитело вводили в комбинации с суточными дозами эрлотиниба. В течение 2,5 недель все опухоли исчезли в группе, получавшей комбинацию PB8532 с эрлотинибом. Контрольное антитело PB17160, направленное на cMet одним Fab-плечом, не вызывало противоопухолевого ответа ни с эрлотинибом, ни без него. Таким образом, специфичное Fab плечо, направленное на cMet, в комбинации с Fab плечом, направленным на EGFR, в биспецифичном антителе PB8532, может преодолеть HGF-опосредованную резистентность к эрлотинибу. В периоде без приема препарата, который начался примерно через 5,5 недель лечения, PB8532 был явно более эффективным, чем эрлотиниб, в уменьшении объема опухоли (Фигура 21), и в группе, которой вводили комбинацию PB8532 + эрлотиниб не наблюдали никакого роста опухоли.

Биспецифичное антитело к cMETxEGFR PB19478 также было способно индуцировать противоопухолевый ответ у мышей NSG-hHGFki, которым трансплантировали клетки HCC827 (Фигура 22). Этот эффект был больше, когда антитело вводили в комбинации с суточными дозами эрлотиниба. В течение 2

недель все опухоли исчезли при комбинации PB19478 с эрлотинибом или без него. При применении эрлотиниба опухоль не появлялась вновь в исследуемый период. Без эрлотиниба опухоль вновь появлялась около 50-го дня и оставалась на уровне обнаружения, пока, наконец, не увеличивалась дальше на 80-й день.

Гуманизированное моноклональное антитело эмибетузумаб (LY3875358) было менее эффективным, в том числе в сочетании с ингибитором EGFR эрлотинибом. Таким образом, специфичное Fab плечо, направленное на cMet, в комбинации с Fab плечом, направленным на EGFR, в биспецифичном антителе PB8532 или PB19478, может преодолеть HGF-опосредованную резистентность к эрлотинибу.

На Фигуре 23 показано, что при лечении опухолей в тот момент, когда начинает развиваться резистентность к эрлотинибу, наблюдается немедленное действие биспецифичного антитела PB19478.

Рассматриваемые совместно, данные, полученные на этой модели ксенотрансплантата опухолевых клеток HCC827, которые трансплантировали иммунодефицитным мышам NSG-hHGFki, показывают, что PB8532, PB19478 и антитела, имеющие аналогичные последовательности VH, приведенные на Фигурах 7 и 8, обладают способностью преодолевать HGF-опосредованную резистентность к эрлотинибу *in vivo*. Комбинированное лечение продолжает быть эффективным и после прекращения лечения.

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Ahmed, M et al. Lack of *in Vivo* Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity with Antibody containing gold particles/ *Bioconjugate chemistry* (2015): 26 812-816. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00139.
- Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993;73: 611–20.
- Castoldi, R., et al. "A novel bispecific EGFR/Met antibody blocks tumor-promoting phenotypic effects induced by resistance to EGFR inhibition and has potent antitumor activity." *Oncogene* 32.50 (2013): 5593-5601.
- Chen et al., MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012;11(3):650-669
- Ferguson KM. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 2008;37: 353–73.
- Fong JT, et al., Alternative signaling pathways as potential therapeutic targets for overcoming EGFR and c-Met inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e78398.
- Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D. Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 1993; 363:88–92.
- Gulli LF1, Palmer KC, Chen YQ, Reddy KB. 1996. Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ*. Feb;7(2):173-8.

- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003;284:31–53.
- Kim, George P., and Axel Grothey. "Targeting colorectal cancer with human anti-EGFR monoclonal antibodies: focus on panitumumab." *Biologics* 2.2 (2008): 223-228.
- Kim, Ki-Hyun and Kim, Hyori. Progress of antibody-based inhibitors of the HGF-cMET axis in cancer therapy. *Experimental & Molecular medicine* (2017), e307; doi:10.1038/emm.2017.17)
- Morgillo F, et al. *ESMO Open* 2016;1:e000060. doi:10.1136/esmoopen-2016-000060
- Moores, Sheri L., et al. "A novel bispecific antibody targeting EGFR and cMet is effective against EGFR inhibitor-resistant lung tumors." *Cancer research* 76.13 (2016): 3942-3953.
- Nakade et al. Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2014, 9(6):775-83.
- Prigent SA, Gullick WJ. Identification of cErbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 30-kinase and SHC using an EGF receptor/c-ErbB-3 chimera. *EMBO J* 1994;13:2831–41.
- Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 2000;16:368.
- Soltoff SP, Carraway KL, III, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:3550–8.
- Yano et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 2008, 15;68(22):9479-87.
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37 (Suppl 4):S3–S8.
- Zhang et al., MET kinase inhibitor SGX523 synergizes with epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in a hepatocyte growth factor-dependent fashion to suppress carcinoma growth. *Cancer Res* 2010, 70:6880-6890.
- US20120107234A1_Symphogen patent "PAN HER antibody composition".
125084 Erbitux Pharmacology Review Part 2 – FDA.

Наименование	Международное непатентованное наименование (INN)	Эпитоп	Метод анализа, МОА
5D5	MetMAb	Домен Sema	Блок HGF
13.3.2			
224G11			
C8-H241	LY-2875358		Блок HGF, интернализация
R13	13-MET		

Таблица 1. Референсные антитела с известной специфичностью к внеклеточным доменам cMET.

5

MF тест.	Конкуренция фагов с референсными антителами						
	без IgG	13.3.2	5D5	R13	224G11	C8H241	R28
4040	1.915	1.818	0.066	1.608	1.907	1.979	1.787
4297	1.769	0.072	1.499	1.332	1.955	1.031	1.885
4356	2.380	2.541	0.088	2.231	2.170	1.806	1.825
13.3.2	2.172	0.311	1.934	1.988	2.221	1.893	2.129
5D5	1.868	1.773	0.164	1.660	2.025	2.054	2.035
R13	1.693	1.590	1.549	0.090	1.878	0.078	1.794

Таблица 2. Конкуренция референсных антител cMet с антителами cMET cLC. Показаны значения OD450. Значения OD450 указывают на наличие или отсутствие конкуренции с указанным антителом. MF4506 не тестировали.

10

PB	MF PB			
	EGFR		cMET	
PB7678	MF4280	EGYYETTTYYNLFDS	MF4298	KLEPTGYYYYYMDV
PB7679	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4487	KTSRYSGYHYMDV
PB7686	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4507	AHYDILTG
PB8021	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF3462	GKSHYSWDAFDY
PB8218	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4040	GTYYYGSGSFSTRVDAFDV
PB8244	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4044	QSRYSYGYASYFDY
PB8292	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4130	QRRAYSGYNWYFDL
PB8301	MF4280	EGYYETTTYYNLFDS	MF4130	QRRAYSGYNWYFDL
PB8316	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4293	RNDFWSGYLFDY
PB8339	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4294	KTTVGYYYYYMDV
PB8340	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4294	KTTVGYYYYYMDV
PB8364	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4296	GPELGYYYYYMDI
PB8388	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4297	ASSMITFGGVIVSWFDP
PB8511	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4301	RVNRYSGYATYFDL
PB8532	MF3370	DRHWHWWLDAFDY	MF4356	ETYYDRGGYPFDP
PB8535	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4356	ETYYDRGGYPFDP
PB8545	MF4281	GDLFITGTLDY	MF4356	ETYYDRGGYPFDP
PB8582	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4491	RTSRYSGYHYLDV
PB8583	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4491	RTSRYSGYHYLDV
PB8607	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4505	LLYDLFDL
PB8639	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4506	SIDMATITDAFDI
PB8640	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4506	SIDMATITDAFDI
PB8687	MF3752	DRNWGWDFDY	MF4508	GTTGNPYFYFYMDV
PB8688	MF3755	ERFLEWLHFDY	MF4508	GTTGNPYFYFYMDV

Таблица 3. Перечень 24 биспецифичных антител к cMETxEGFR, отобранных после экспериментов по дозозависимому титрованию в анализе пролиферации N87 HGF/EGF. Указаны номера MF плеч к EGFR и cMET в каждом отдельном PB, а также их последовательность HCDR3.

PB	MF PB		Анализы пролиферации N87		
	EGFR	cMET	HGF/ EGF	HGF	EGF
PB7678	MF4280	MF4298	+	+	+
PB7679	MF3755	MF4487	++	-	++
PB7686	MF3755	MF4507	++	+	+
PB8021	MF3755	MF3462	+	+	+
PB8218	MF3752	MF4040	++	+++	+
PB8244	MF3755	MF4044	++	+	++
PB8292	MF3755	MF4130	++	+	++
PB8301	MF4280	MF4130	+	++	+
PB8316	MF3755	MF4293	++	+	+
PB8339	MF3752	MF4294	+	+	+
PB8340	MF3755	MF4294	++	+	++
PB8364	MF3755	MF4296	++	+	++
PB8388	MF3755	MF4297	++	+++	++
PB8511	MF3755	MF4301	++	+++	++
PB8532	MF3370	MF4356	+	+++	+
PB8535	MF3755	MF4356	++	+++	++
PB8545	MF4281	MF4356	+	+++	+
PB8582	MF3752	MF4491	+	-	+
PB8583	MF3755	MF4491	++	+++	++
PB8607	MF3755	MF4505	++	-	++
PB8639	MF3752	MF4506	+	+++	+
PB8640	MF3755	MF4506	++	+++	++
PB8687	MF3752	MF4508	+	++	+
PB8688	MF3755	MF4508	+	-	+

Таблица 4. Краткое описание экспериментов по разведению антител, выполненных с использованием анализа пролиферации N87 HGF/EGF, HGF и EGF с использованием 24 биспецифичных антител к cMETxEGFR. Биспецифичные молекулы обозначаются как PBXXXX, а различные Fab-плечи как MGXXXX. Активность биспецифичных молекул в индивидуальных анализах указывается как: - отсутствие эффекта; + ингибирование пролиферации ниже, чем положительный контроль; ++ = ингибирование пролиферации, сопоставимое с положительным контролем - антителом 5D5 Fab; +++ = ингибирование пролиферации выше, чем положительный контроль - антителом 5D5 Fab.

5

Биспецифичное антитело	плечо EGFR	Блокирование EGFR по сравнению с цетуксимабом (на основе IC50)	плечо сMET	Перекрестное блокирование референсных антител
PB8535	MF3755	100%	MF4356	5D5
PB8640	MF3755	100%	MF4506	H/O
PB8388	MF3755	100%	MF4297	13.3.2
PB8218	MF3752	80%	MF4040	5D5
PB8532	MF3370	80%	MF4356	5D5

Таблица 5. Состав наиболее эффективных биспецифичных антител к EGFRхсMET и их конкуренция с референсными антителами.

5

Биспецифичное антитело	плечо сMET	плечо EGFR	Повышенная АЗКЦ (ADCC)
Цетуксимаб	-	-	-
PB8532p05	MF4356	MF3370	Нет
PB19474p01	MF4356	MF8232	Да
PB19475p01	MF4356	MF8233	Да
PB19476p01	MF8230	MF3370	Да
PB19477p01	MF8230	MF8232	Да
PB19478p01	MF8230	MF8233	Да
PB8532p06	MF4356	MF3370	Да
PB8532p04	MF4356	MF3370	Нет
	плечо HER-3	плечо EGFR	
PB4522p34	MF3178	MF4280	Да
PB4522p25	MF3178	MF4280	Нет
	плечо TT	плечо TT	
PG1337p218	MF1337	MF1337	Нет

Таблица 6. Состав биспецифичных антител. Номер рXX указывает номер производственного цикла и может применяться для определения того, было ли антитело произведено в версии с АЗКЦ (ADCC) или нет.

10

Формула изобретения

1. Биспецифичное антитело, содержащее первый вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR) и второй вариабельный домен, который может связывать внеклеточную часть рецепторной тирозинкиназы человека, кодируемой прото-онкогеном MET (сMET).
2. Биспецифичное антитело по п. 1, содержащее общую легкую цепь.
3. Биспецифичное антитело по п. 1 или п. 2, которое представляет собой антитело человека.
4. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-3, которое представляет собой полноразмерное антитело.
5. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-4, которое представляет собой антитело класса IgG1, имеющее стехиометрию анти-EGFR, анти-сMET 1:1.
6. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-5, которое имеет один вариабельный домен, который может связывать EGFR, и один вариабельный домен, который может связывать сMET.
7. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что указанный вариабельный домен, который может связывать EGFR человека, может также связывать EGFR яванского макака и мыши.
8. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что указанный вариабельный домен, который может связывать EGFR человека, связывает домен III EGFR человека.
9. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что указанный вариабельный домен, который может связывать сMET, блокирует связывание антитела 5D5 с сMET.
10. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-9, отличающееся тем, что указанный вариабельный домен, который может связывать сMET, блокирует связывание HGF с сMET.
11. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что аминокислоты в положениях 405 и 409 в одном домене СН3 являются такими же, как аминокислоты в соответствующих положениях в другом домене СН3 (EU-нумерация).
12. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-11, отличающееся тем, что указанный первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой

цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYX₁X₂NTNYAQKLQG и CDR3, который содержит последовательность X₃X₄X₅X₆HWLX₇A, в которой

- 5 X₁ = N или S; X₂ = A или G; X₃ = D или G; X₄ = R, S или Y; X₅ = H, L или Y; X₆ = D или W и X₇ = D или G; с 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией в положении, отличном от X₁-X₇, и при этом указанный второй переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинацией.

13. Биспецифичное антитело по п. 12, отличающееся тем, что
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 15 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = S; X₅ = Y; X₆ = W и X₇ = G;
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G;
 20 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G; или
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = G; X₄ = Y; X₅ = L; X₆ = D и X₇ = G
14. Биспецифичное антитело по п. 12 или п. 13, отличающееся тем, что
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D;
 25 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D; или
 X₁ = S; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D.
15. Биспецифичное антитело по любому из пп. 12-14, отличающееся тем, что
 X₁ = N; X₂ = G; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D; или
 30 X₁ = N; X₂ = A; X₃ = D; X₄ = R; X₅ = H; X₆ = W и X₇ = D.
16. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи указанного второго переменного домена содержит аминокислотную последовательность с одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-3; 7; 8; 10; 13; 15; 16; 17; 21; 22 или 23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.
- 35 17. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи указанного второго переменного домена содержит аминокислотную последовательность с одной из последовательностей SEQ ID NO: 2; 7; 8; 10; 13 или 23 с 0-10, предпочтительно 0-5, вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или их комбинациями.
- 45 18. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-17, отличающееся тем, что указанный первый переменный домен содержит переменную область тяжелой

цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNGNTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и при этом второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQQFTG и последовательностью CDR3 EYYYDRGGYPFDP.

19. Биспецифичное антитело по любому из п. 1-17, отличающееся тем, что указанный первый вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 SYGIS; последовательностью CDR2 WISAYNANTNYAQLQG и CDR3, который содержит последовательность DRHWHWWLDA, и при этом второй вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1 TYSMN; последовательностью CDR2 WINTYTGDPITYAQQFTG и CDR3, который содержит последовательность EYFYDRGGYPFDP.

20. Биспецифичное антитело по любому из пунктов 1-19, отличающееся тем, что указанные первый и второй вариабельные домены содержат общую легкую цепь, предпочтительно легкую цепь, показанную на Фигуре 9B.

21. Антитело по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что указанное антитело ингибирует HGF-индуцированный рост клетки, на рост которой влияет HGF.

22. Антитело по любому из пп. 1-21, отличающееся тем, что указанное антитело ингибирует EGF-индуцированный рост клетки, на рост которой влияет EGF.

23. Антитело по любому из пп. 1-22 для применения при лечении заболевания, включающего аберрантные клетки.

24. Биспецифичное антитело по любому из пунктов 1-23, для применения при лечении субъекта, который имеет опухоль.

25. Биспецифичное антитело для применения по п. 24, отличающееся тем, что указанная опухоль представляет собой EGFR-положительную опухоль, cMET положительную опухоль или EGFR и cMET положительную опухоль.

26. Биспецифичное антитело для применения по п. 24 или п. 25, отличающееся тем, что указанная опухоль представляет собой рак молочной железы; рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких, включая немелкоклеточный рак легких, или рак мочевого пузыря.

27. Биспецифичное антитело для применения по любому из пп. 24-26, отличающееся тем, что указанная опухоль устойчива к лечению ингибитором тирозинкиназы EGFR.

28. Биспецифичное антитело по п. 27, отличающееся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб, gefitinib или афатиниб, аналог эрлотиниба, gefitiniba или афатиниба или комбинацию одного или более соответствующих соединений и/или их аналогов.
- 5
29. Биспецифичное антитело для применения по п. 28, отличающееся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб.
30. Биспецифичное антитело для применения по любому из пп. 23-29, отличающееся тем, что указанное лечение дополнительно включает лечение ингибитором тирозинкиназы EGFR.
- 10
31. Биспецифичное антитело для применения по п. 30, отличающееся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб.
- 15
32. Биспецифичное антитело для применения по п. 30 или 31, отличающееся тем, что указанное биспецифичное антитело вводят одновременно, последовательно или раздельно с указанным ингибитором тирозинкиназы EGFR.
- 20
33. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-22, для применения при лечении заболевания, включающего аберрантные клетки, причем указанное биспецифичное антитело вводят одновременно, последовательно или раздельно с ингибитором тирозинкиназы EGFR.
- 25
34. Способ лечения субъекта, который имеет опухоль, указанный способ включает введение биспецифичного антитела по любому из пп. 1-22 индивидууму, нуждающемуся в указанном введении.
- 30
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный индивидуум имеет заболевание, включающее аберрантные клетки.
- 35
36. Способ по п. 34 или п. 35, отличающийся тем, что указанная опухоль представляет собой EGFR положительную опухоль, cMET положительную опухоль или EGFR и cMET положительную опухоль.
- 40
37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что указанная опухоль представляет собой рак молочной железы; рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких, включая немелкоклеточный рак легких или рак мочевого пузыря.
- 45
38. Способ по любому из пп. 34-37, отличающийся тем, что указанная опухоль резистентна к лечению ингибитором тирозинкиназы EGFR.
39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб, gefitinib или афатиниб,

аналог эрлотиниба, гефитиниба или афатиниба или комбинацию одного или более соответствующих соединений и/или их аналогов.

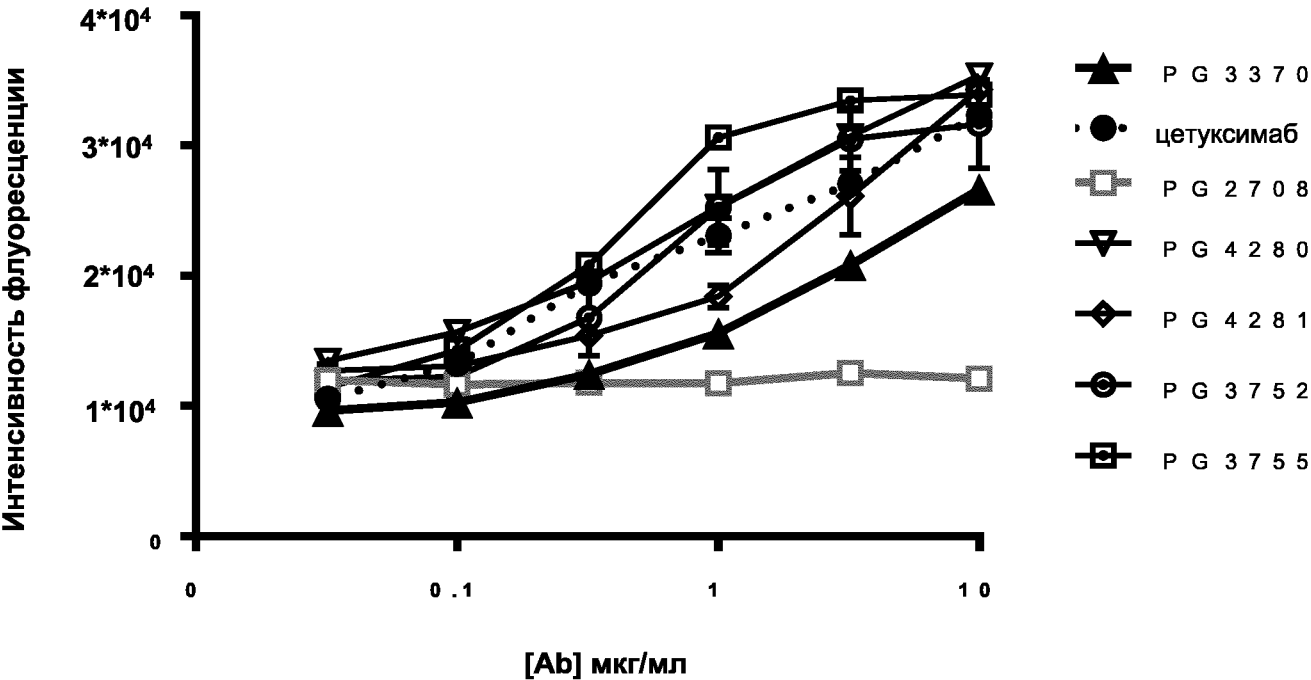
- 5 40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб.
- 10 41. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное лечение дополнительно включает введение ингибитора тирозинкиназы EGFR индивидууму, нуждающемуся в указанном введении.
- 15 42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы EGFR представляет собой эрлотиниб.
43. Способ по п. 41 или п. 42, отличающийся тем, что указанное биспецифичное антитело вводят одновременно, последовательно или отдельно с указанным ингибитором тирозинкиназы EGFR.
- 20 44. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-22 для применения при производстве лекарственного средства для лечения заболевания, включающего аберрантные клетки.
45. Антитело, содержащее переменный домен, способный связывать внеклеточную часть EGFR человека, EGFR мыши и EGFR яванского макака.

Фигура 1

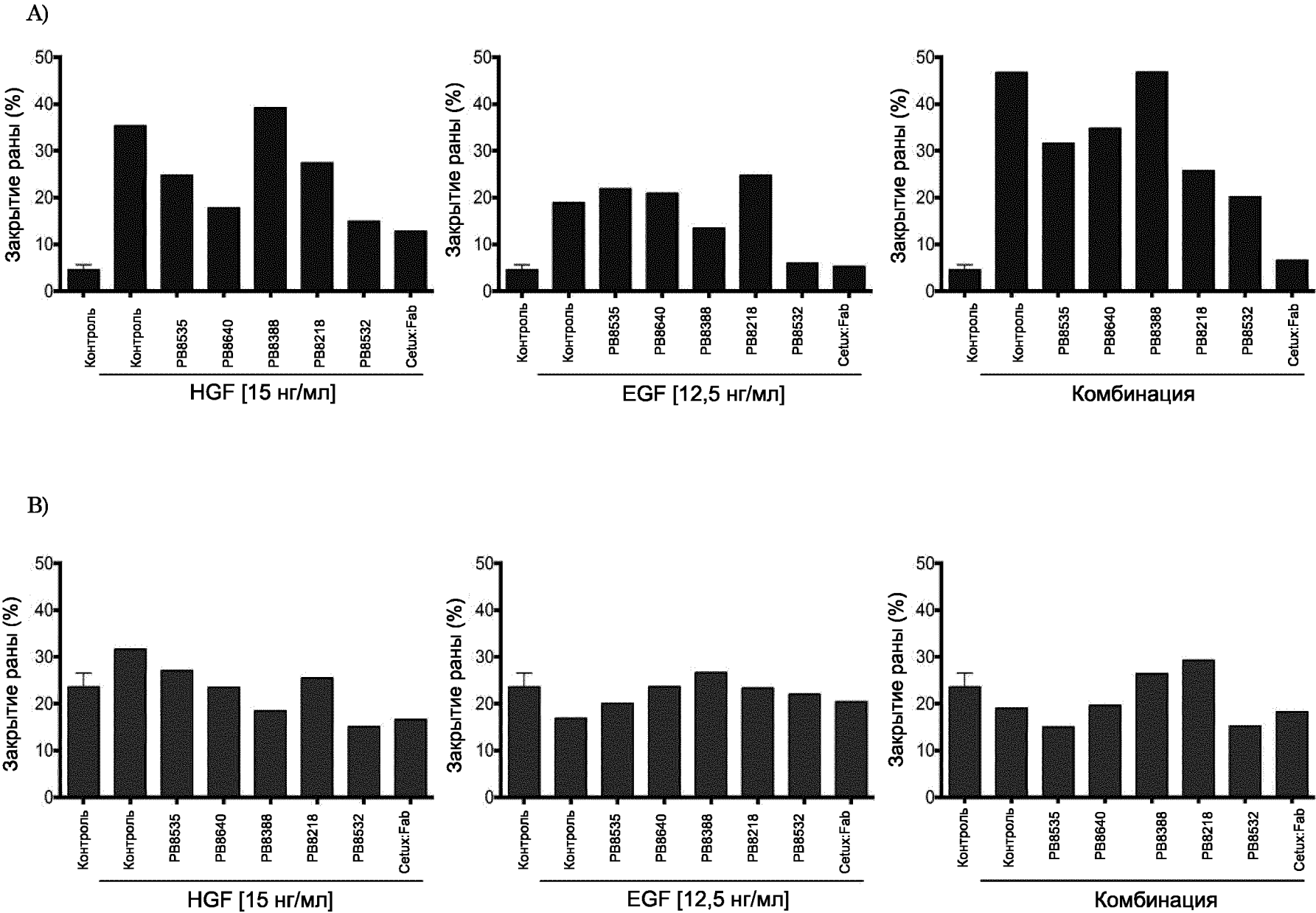
№ MF	Специфичность	Последовательность VH
1337	TT	EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPGGGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTTTVTVSS
3370	EGFR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHWWLDAFDYWGQGTLLTVVSS
3755	EGFR	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNWVRQAPGHGLEWMGWINANTGDPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHFDYWGQGTLLTVVSS
4297	cMet	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTASSMITFGGVIVSWFDPWGQGTLTVTVSS
4356	cMet	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSMNWVRQAPGGGLEWMGWINTYTGDPTYAQGFTGRYVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARETYYYDRGGYPFDPWGQGTLTVTVSS
2708	RSV-G	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSTKYSADSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSFDSSGYRSWFDSWGQGTLTVTVSS

№ MF:	Специфичность	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1337	TT	EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFT	KYDIN	WVRQAPGGGLEWMG	WMSANTGNTGYAQKFQG	RVTMTTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCAR	SSLFKTETAPYYHFALDV	WGQGTTTVTVSS
3370	EGFR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	SYGIS	WVRQAPGGGLEWMG	WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAK	DRHWHWWLDAFDY	WGQGTLLTVVSS
3755	EGFR	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFT	NYAMN	WVRQAPGHGLEWMG	WINANTGDPTYAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTR	ERFLEWLHFDY	WGQGTLLTVVSS
4297	cMET	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	KAWMN	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT	ASSMITFGGVIVSWFDP	WGQGTLLTVVSS
4356	cMET	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT	SYSMN	WVRQAPGGGLEWMG	WINTYTGDPTYAQGFTG	RYVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	ETYYYDRGGYPFDP	WGQGTLLTVVSS
2708	RSV-G	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	NYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSTKYSADSLKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAK	EGWSFDSSGYRSWFDS	WGQGTLLTVVSS

Фигура 2

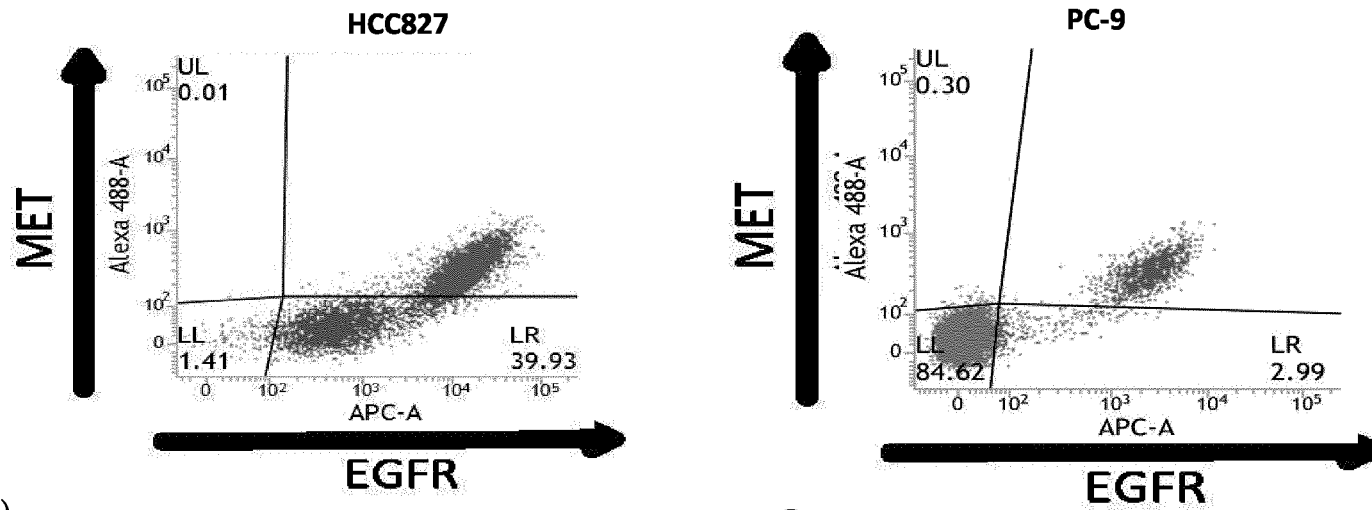


Фигура 3

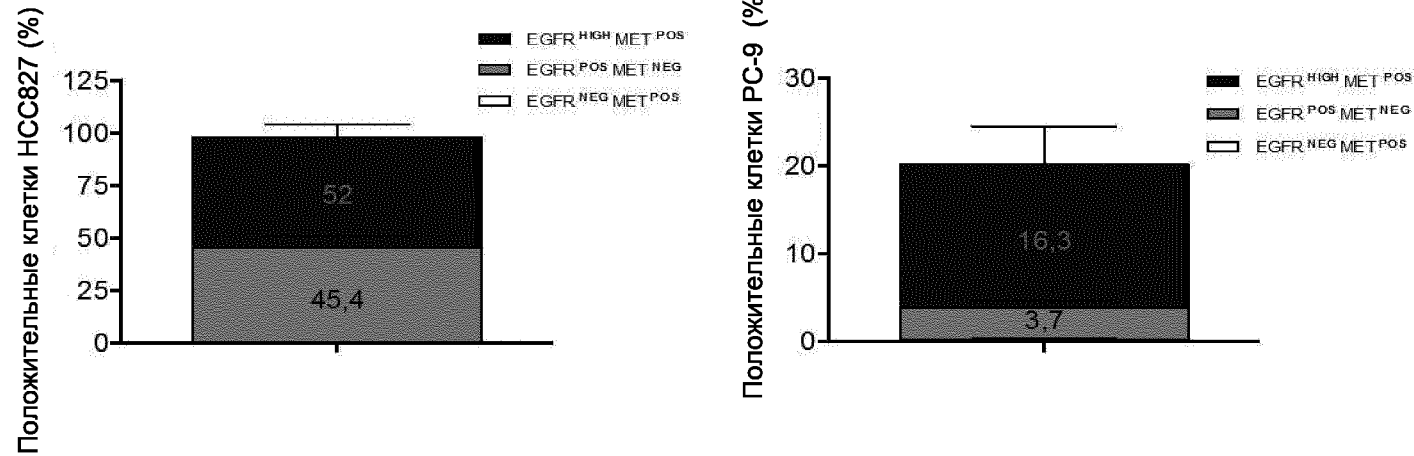


Фигура 4

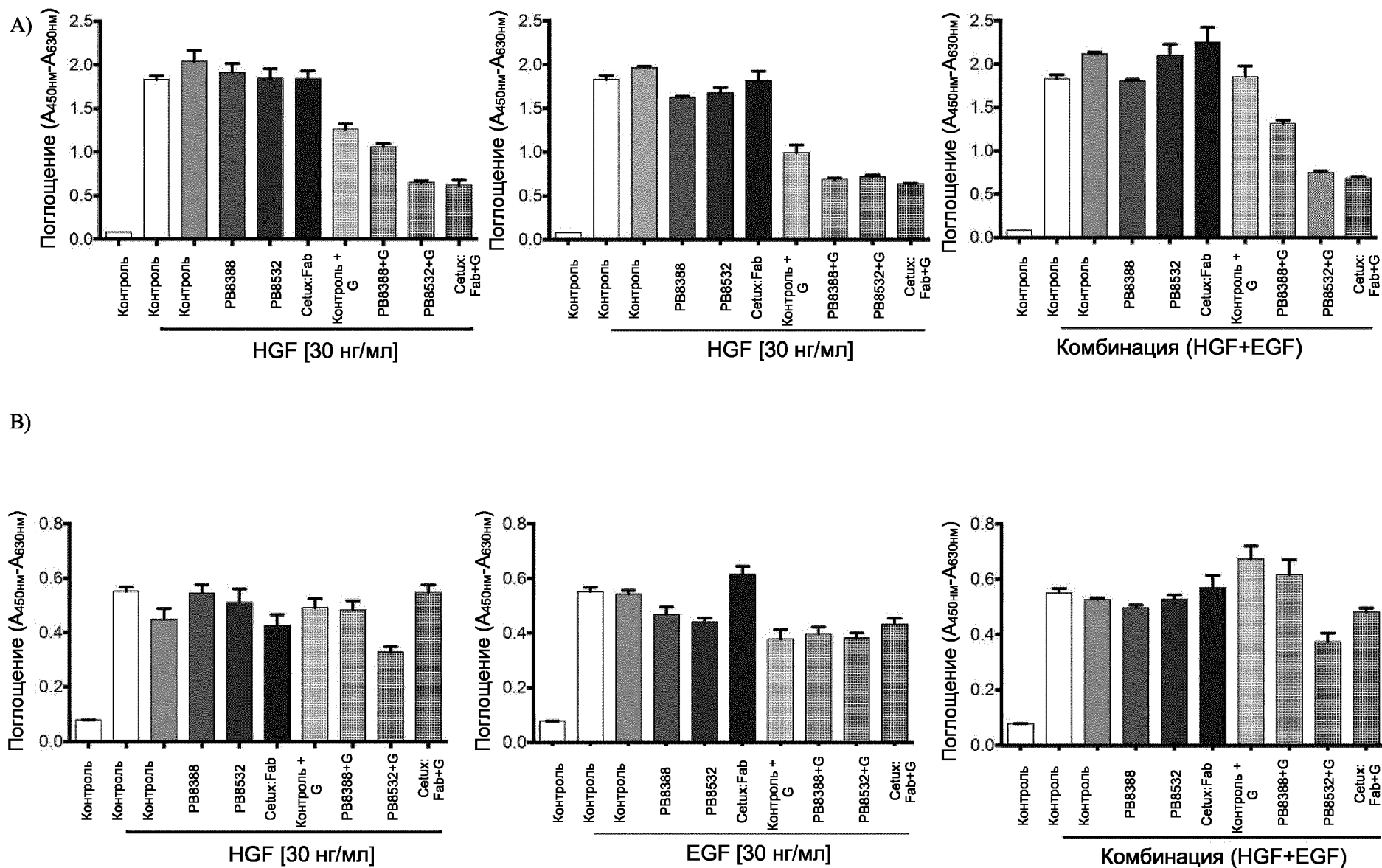
A)



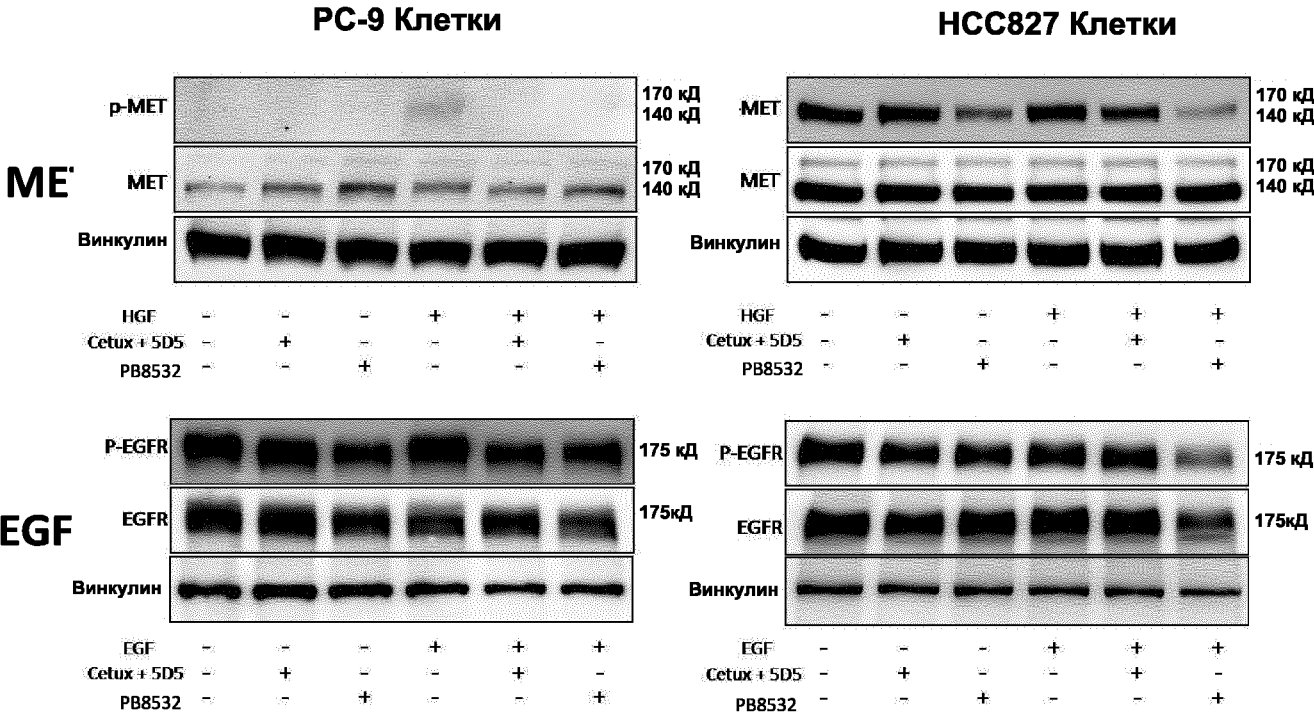
B)



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7

MF3353	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8229	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8228	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF3370	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8233	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8232	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF3393	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8227	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW
MF8226	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW

MF3353	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF8229	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF8228	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDS
MF3370	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF8233	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF8232	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDR
MF3393	ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY
MF8227	ISAYNANTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY
MF8226	ISAYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGY
	****.*****:
MF3353	YWHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
MF8229	YWHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
MF8228	YWHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
MF3370	HWHWWLDAFDYWGQGLVTVSS
MF8233	HWHWWLDAFDYWGQGLVTVSS
MF8232	HWHWWLDAFDYWGQGLVTVSS
MF3393	LDHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
MF8227	LDHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
MF8226	LDHWWLGAFDYWGQGLVTVSS
	****.*****

Фигура 8

MF8225	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSLNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8243	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8224	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8239	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQVPGQGLEWMGW
MF8242	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8237	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSFGMSWVRQAPGQGLEWMGW
MF8240	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8234	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCKASGYTFISYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8245	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAVNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8231	QVQVVQSGSEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8247	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8238	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8230	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8248	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAINWVRQAPGQGLEWMGW
MF8246	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8223	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8222	QVELVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8235	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8236	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8241	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8244	QVQLVQSGSELEKPGASVKVSCKASGYTFTTYSMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF8221	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGW
MF4356	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSMNWVRQAPGQGLEWMGW

.:.:***.:*****
 :.:.:****.*****

MF8225	INTYTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8243	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8224	INTNTGNPTYAQDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8239	INTYTGNPTYVQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8242	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFPLDTSVSTTYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8237	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQINSLKAEDTAVYYCARES
MF8240	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLNTEDTAVYYCARET
MF8234	INTYTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8245	INTYTGNPTYAQGFTGRFVFSSDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8231	INTYTGDPTYVQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8247	INTYTGNPTYVQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8238	INTYTGSPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCARET
MF8230	INTYTGDPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8248	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAHLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8246	INTYTGDPTYAQGFTGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8223	INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSSTAFQLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8222	INTNTGTPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8235	INTNTGTPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8236	INTYTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLTEDTAVYYCARET
MF8241	INTYTGSPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET
MF8244	INTYTGSPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARET

MF8221 INTYTGNTPTVYVQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARET
MF4356 INTYTGDPITYAQGFTGRYVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARET
*** ** ***.*.*****:** *** .*:.***.*.*:*****:*****:

MF8225 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
MF8243 YYYDRGGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 2)
MF8224 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
MF8239 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 4)
MF8242 YYYQSSGYLFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 5)
MF8237 YYYDRNDYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 6)
MF8240 YYYDVGGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 7)
MF8234 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
MF8245 YFYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 9)
MF8231 YFYDRGGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 10)
MF8247 YYYDSSAYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 11)
MF8238 FYFDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 12)
MF8230 YFYDRGGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 13)
MF8248 YYYATSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 14)
MF8246 SYDRTGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 15)
MF8223 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 16)
MF8222 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 17)
MF8235 YYYGSSGYPFAPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 18)
MF8236 YYYESSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 19)
MF8241 YYFDSGDYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
MF8244 YYFDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 21)
MF8221 YYYDSSGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
MF4356 YYYDRGGYPFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 23)
:: : * *****:*****

Фигура 9А:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фигура 9В:

gacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctacttaaattggatcagcagaaacca
 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
 gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
 aggttcagtgaggagtcctgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacct
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctccaacgttcggccaa
 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q
 gggaccaaggtggagatcaaa
 G T K V E I K

Фигура 9С:

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 ggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 tggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 agcttcaacaggggagagtggttag
 S F N R G E C -

Фигура 9D:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFLTITISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK

Фигура 9E:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFLTITISLQPEDFATYYCQQSYSTP

Фигура 10A:**CH1:**

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtcctca
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

Фигура 10B:**Область шарнира:**

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccacccgtgcccc
E P K S C D K T H T C P P C P

Фигура 10C:**CH2:**

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

Фигура 10D:

CH2, содержащая молчание замены L235G и G236R:

```
gcacctgaactcggcaggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacc
A P E L G R G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgagccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccattcgagaaaaccattctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K
```

Фигура 10E:

CH3: KK (DEKK)

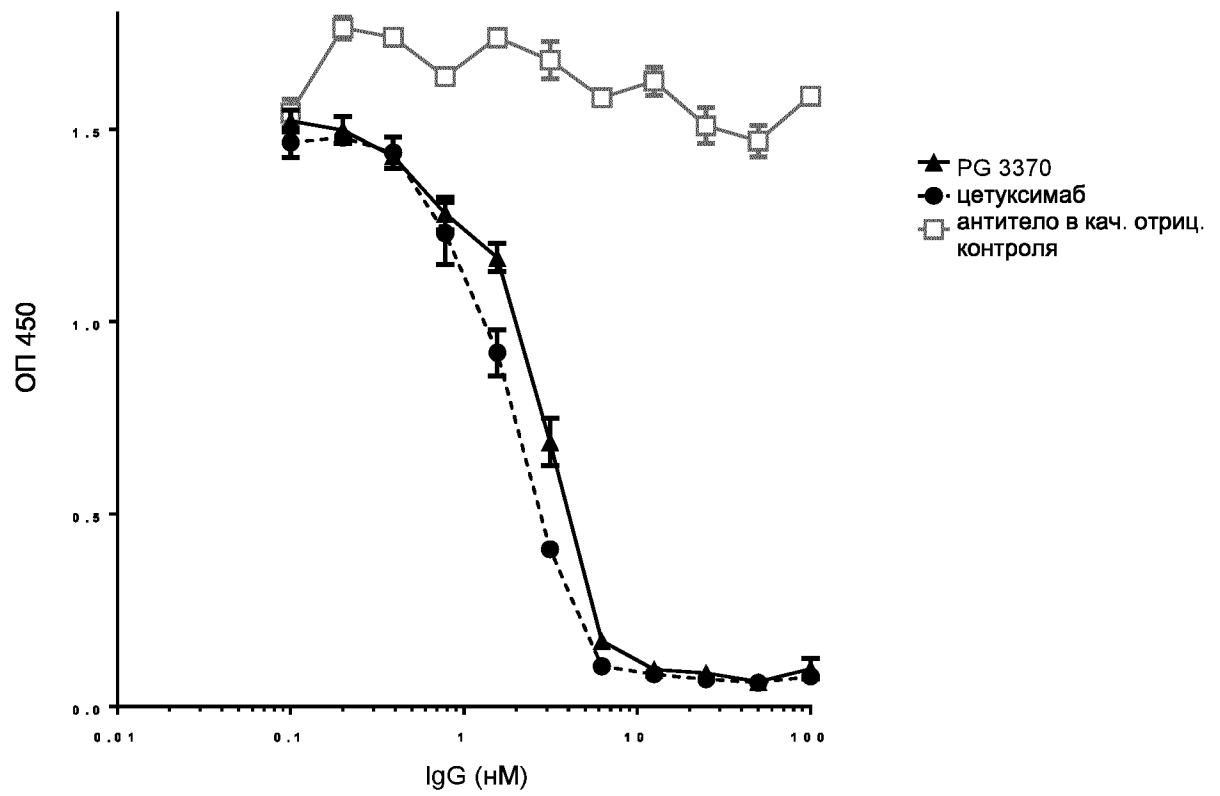
```
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcattgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -
```

Фигура 10F:

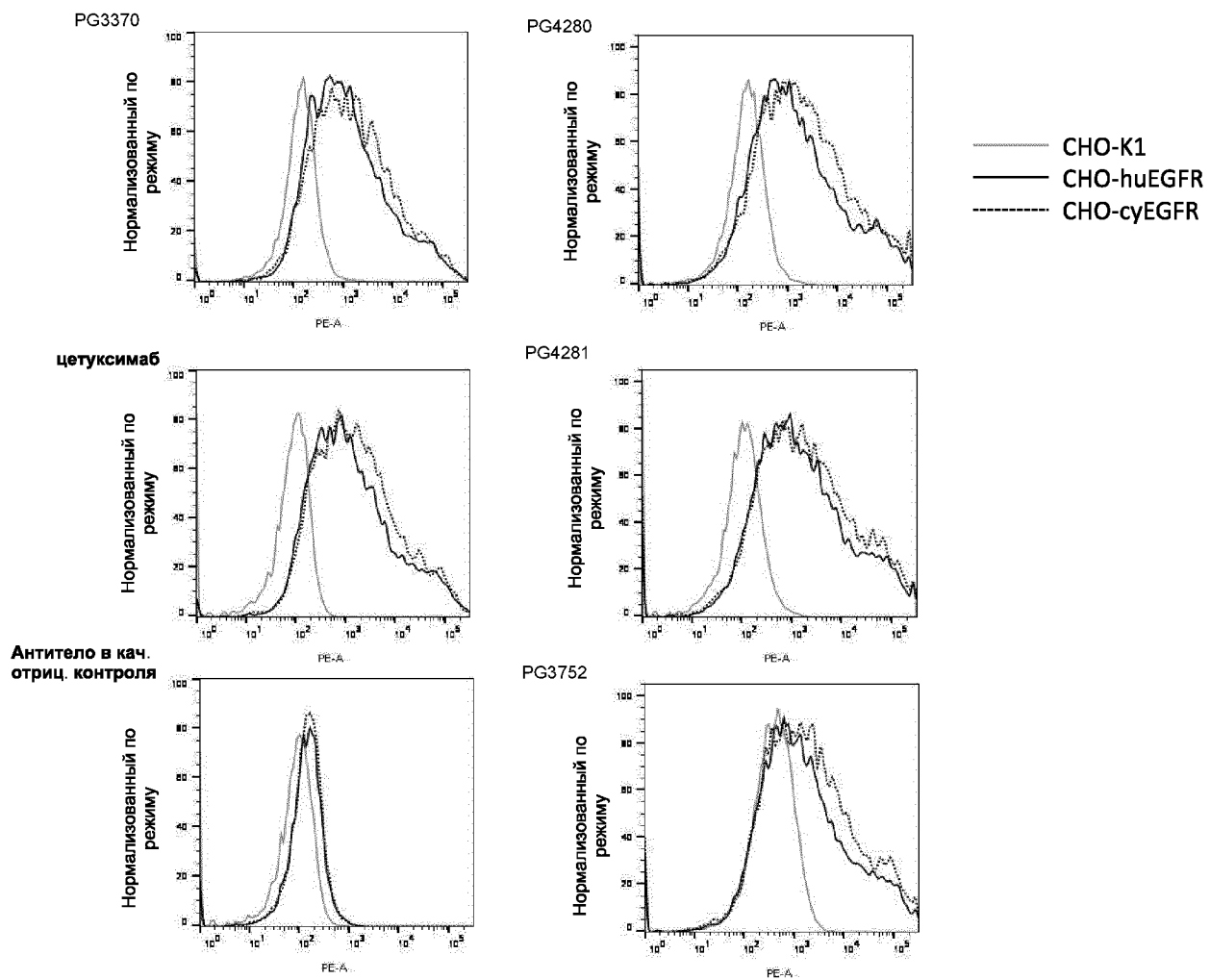
CH3: DE (DEKK)

```
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgacctgcgaggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcattgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -
```

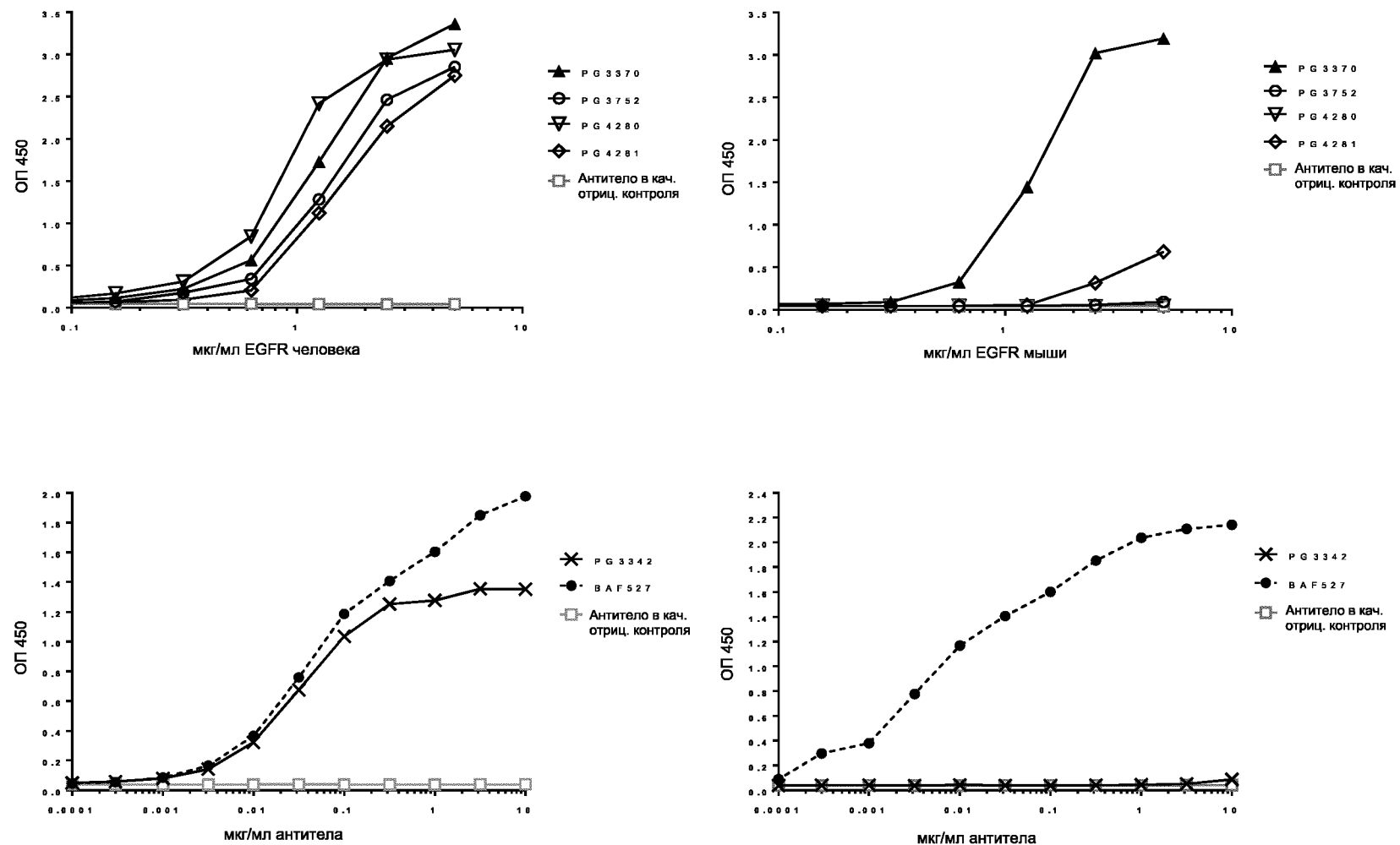
Фигура 11



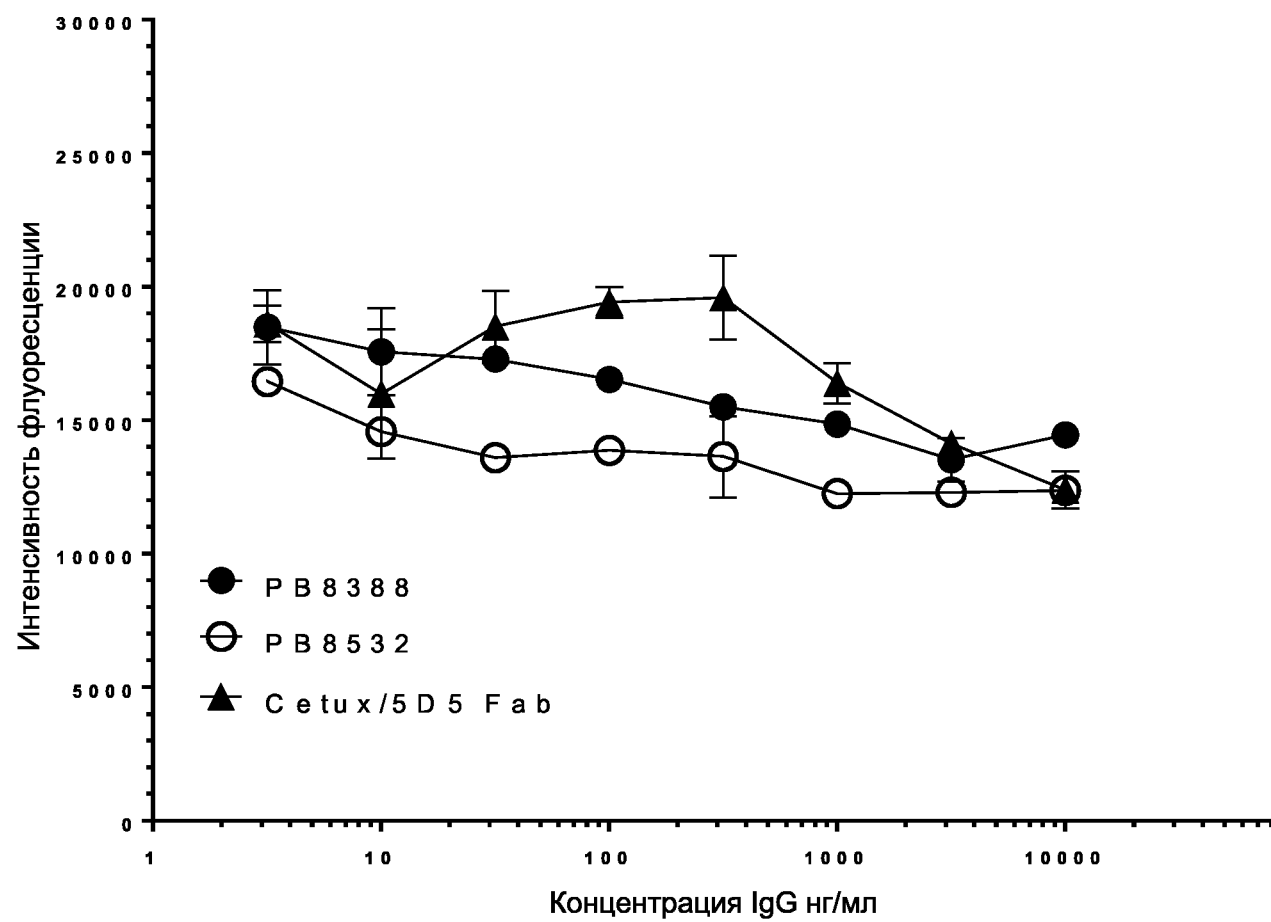
Фигура 12



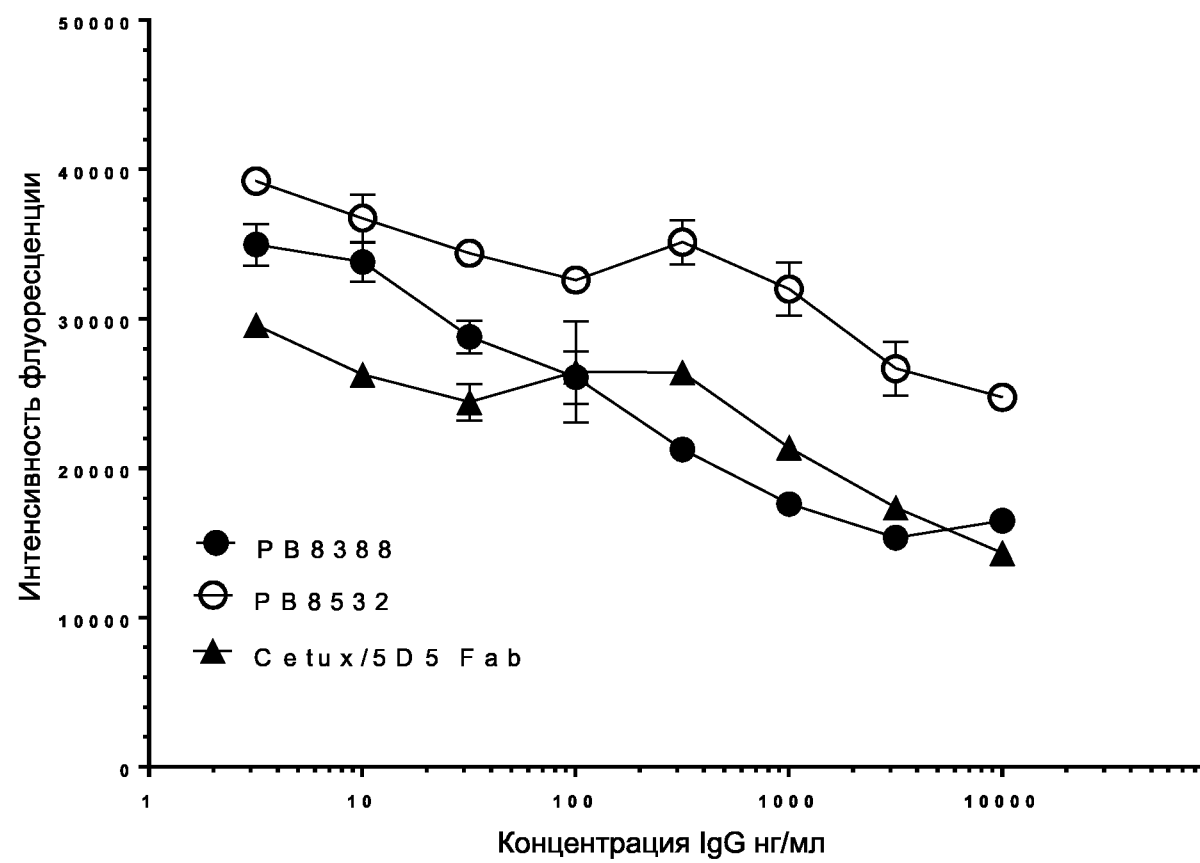
Фигура 13



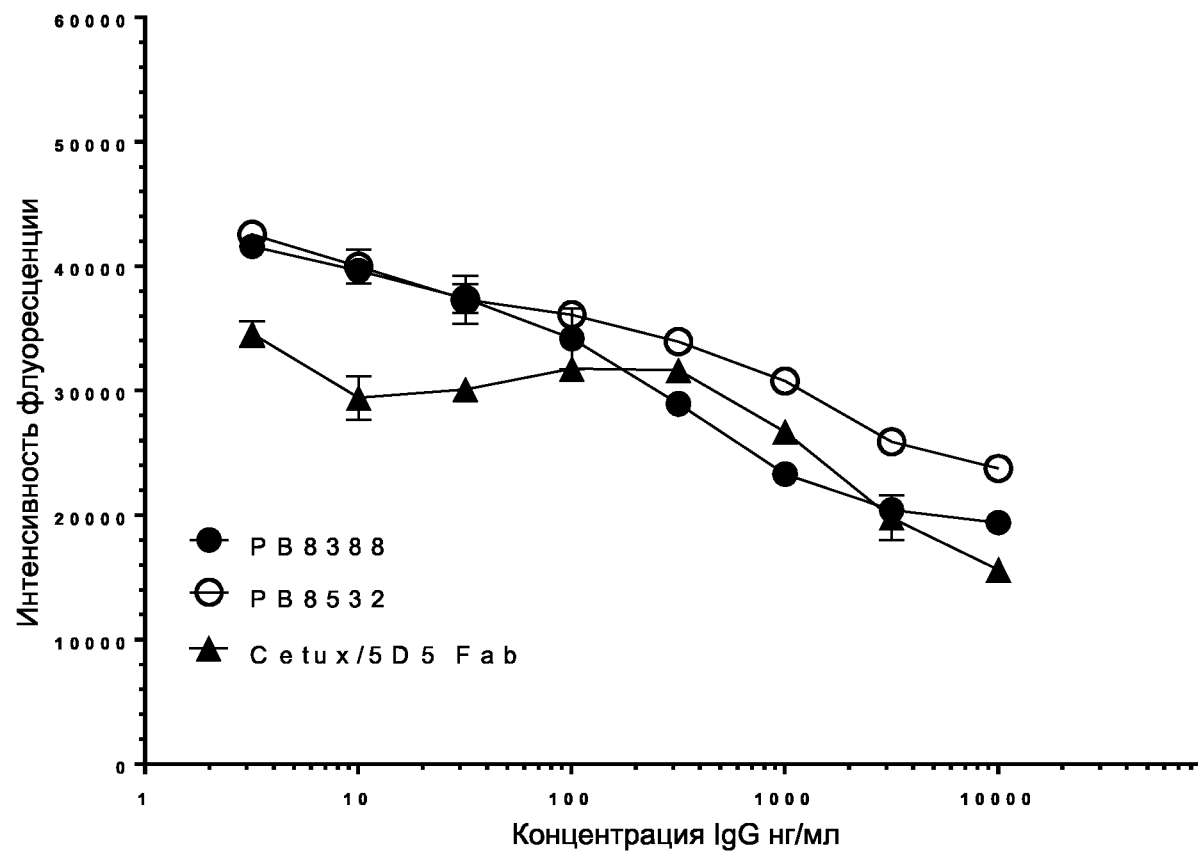
Фигура 14А



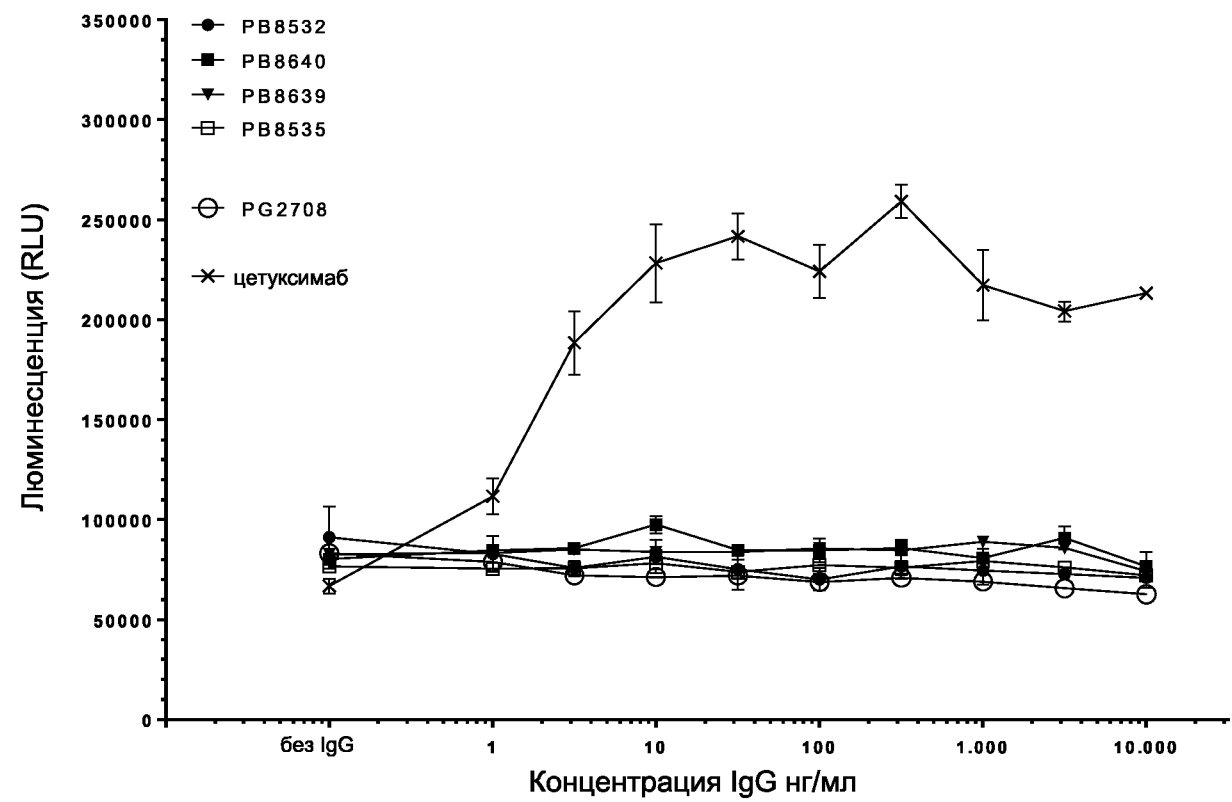
Фигура 14В



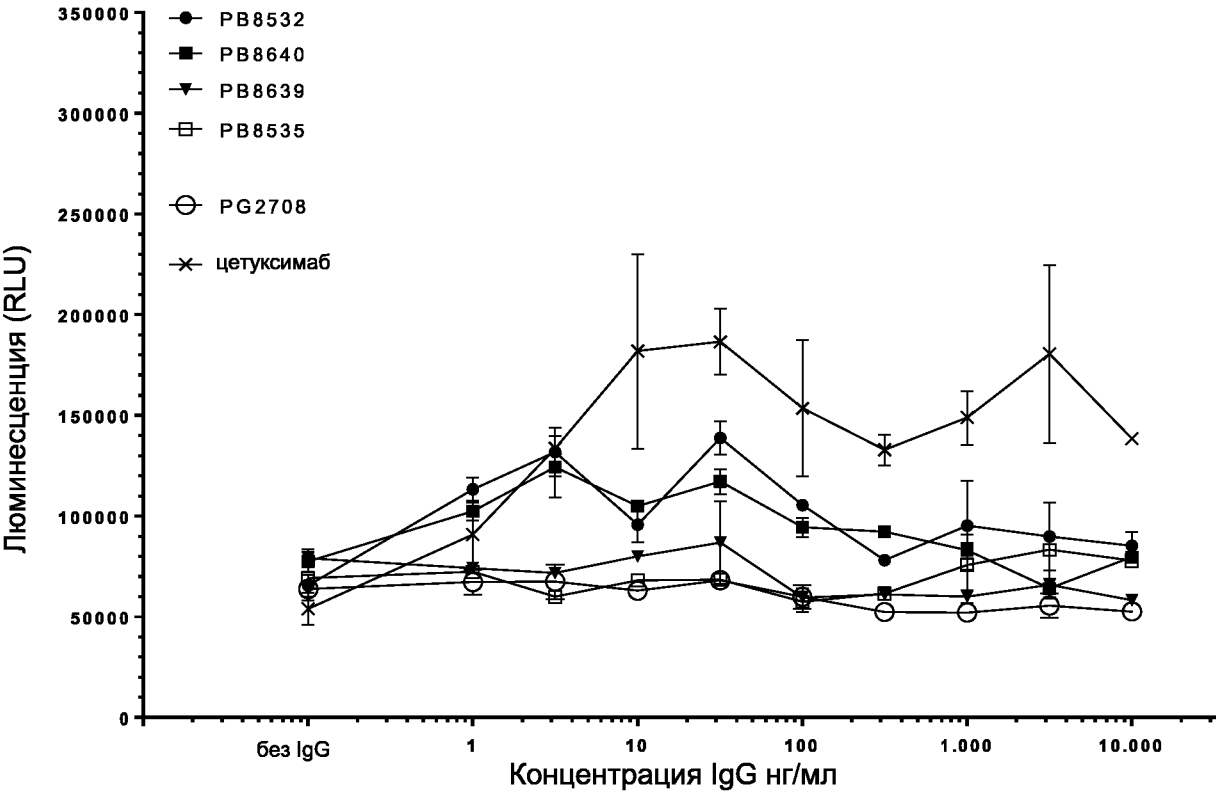
Фигура 14С



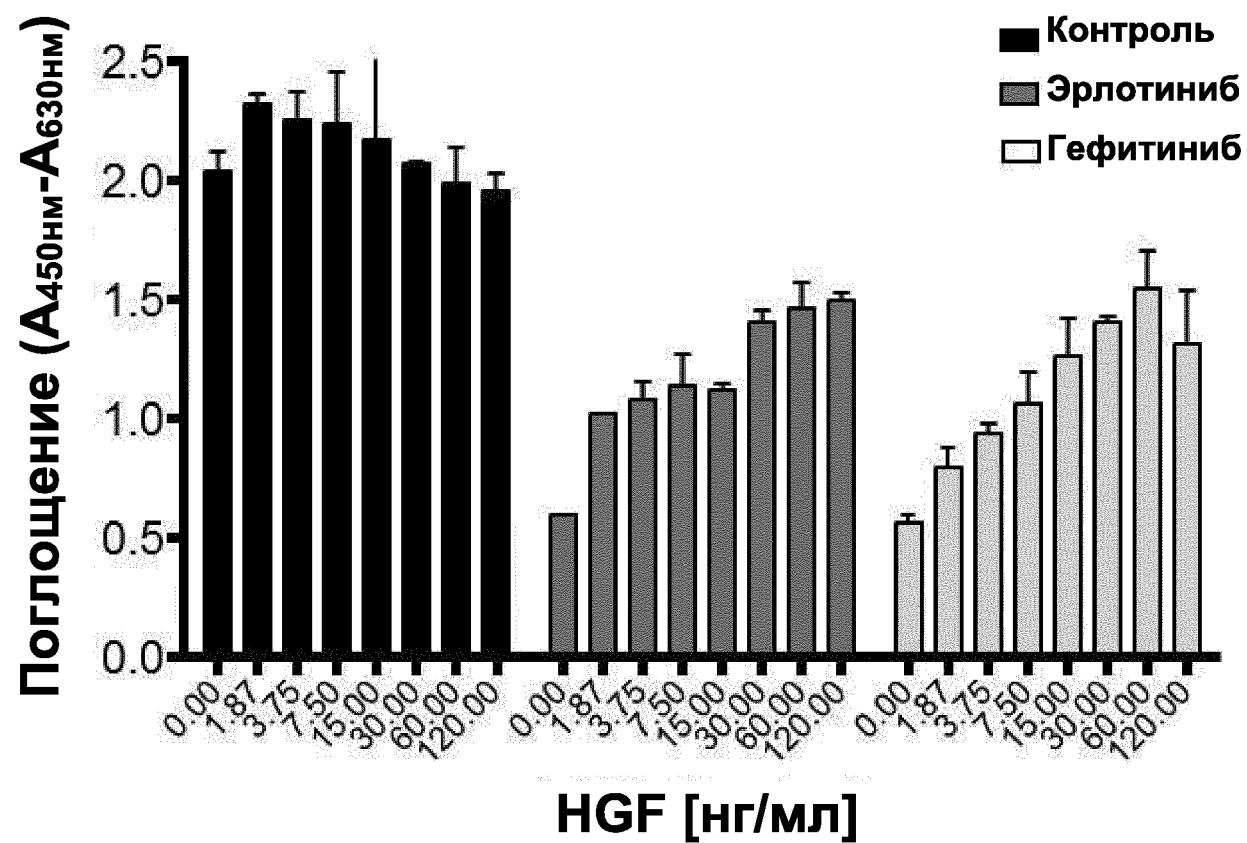
Фигура 15А



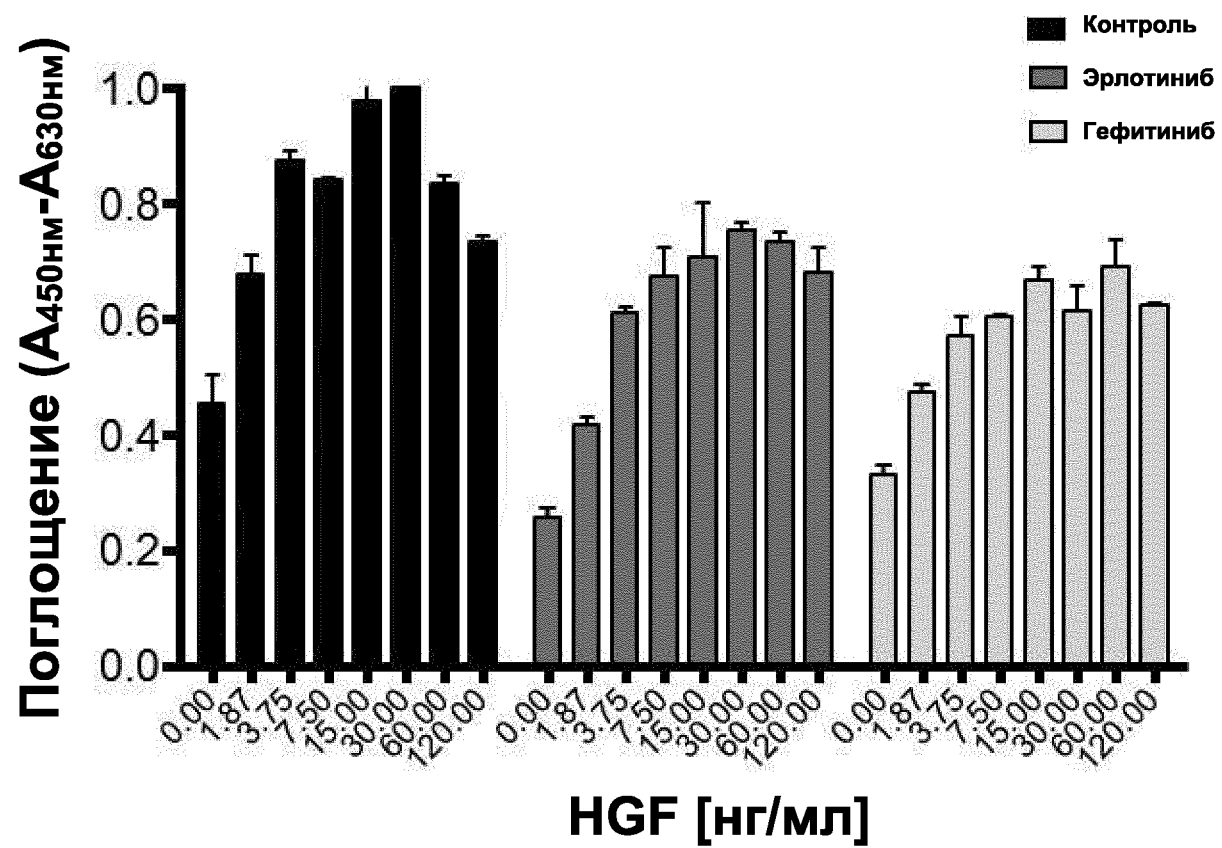
Фигура 15В



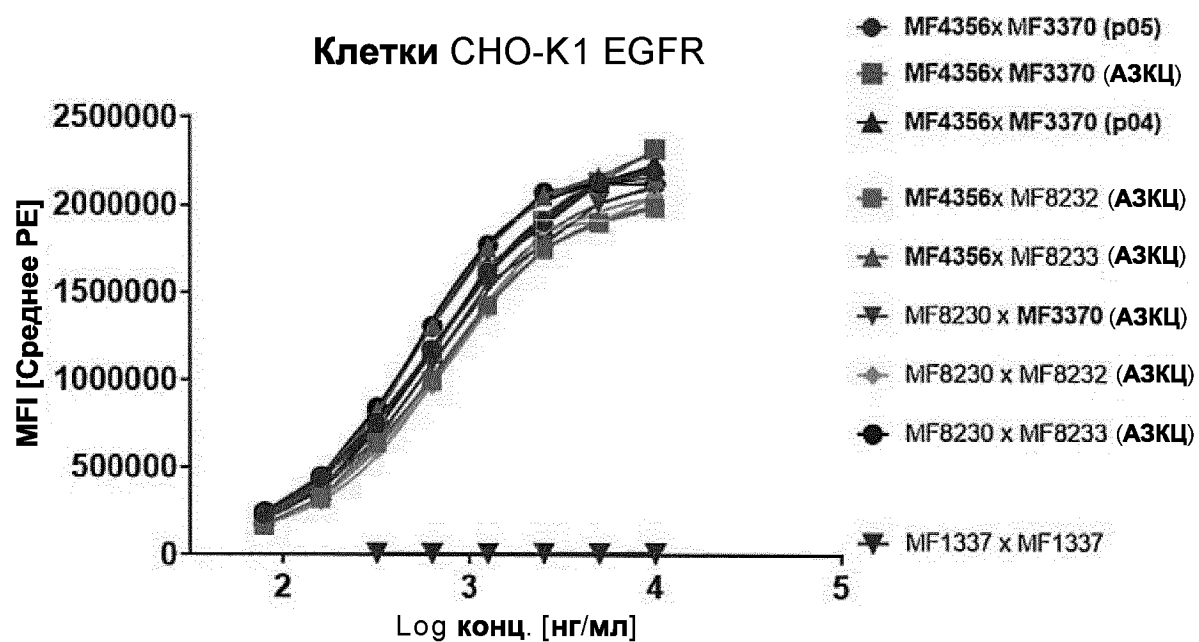
Фигура 16А



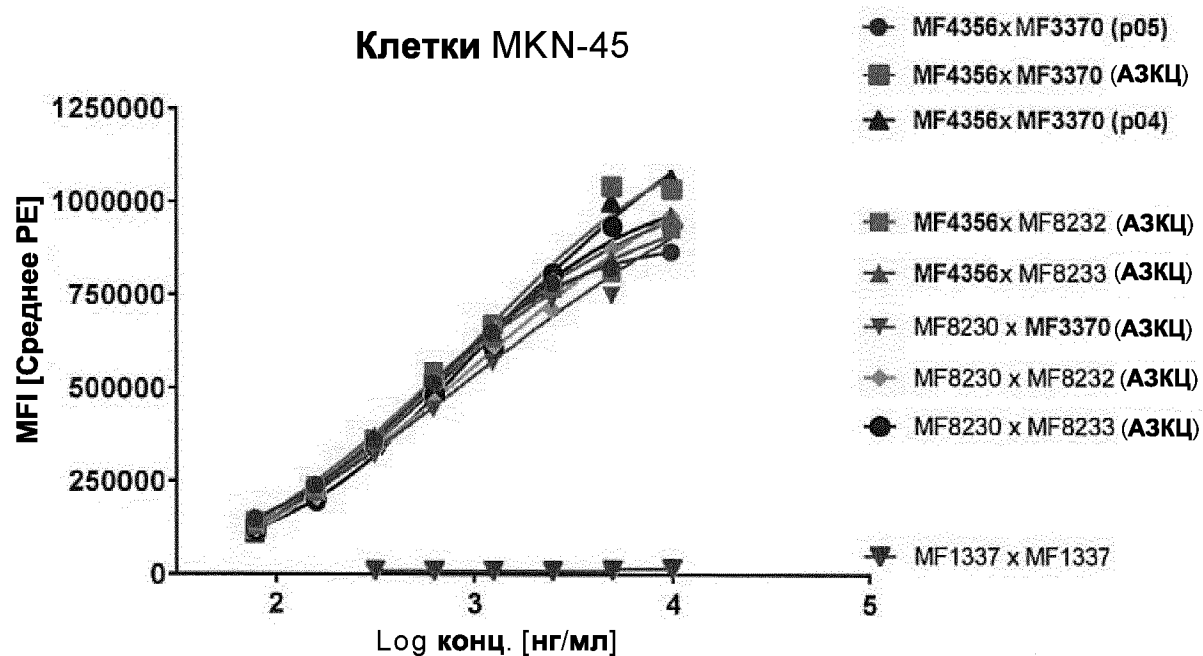
Фигура 16В



Фигура 17А

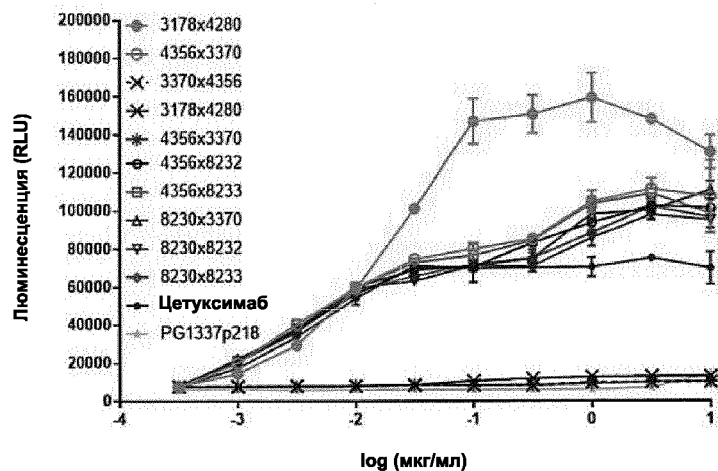


Фигура 17В

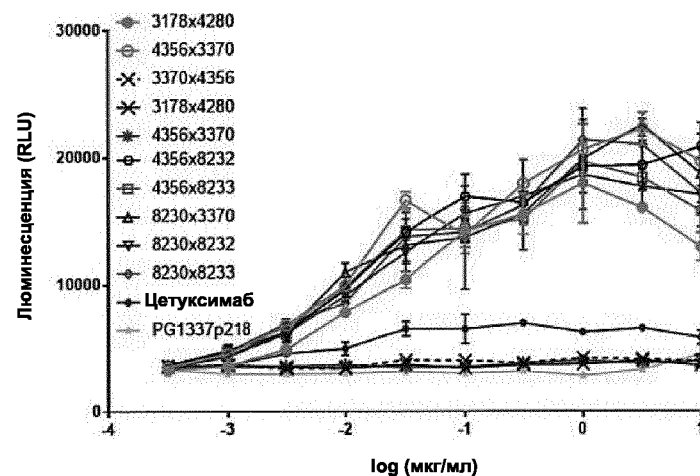


Фигура 18

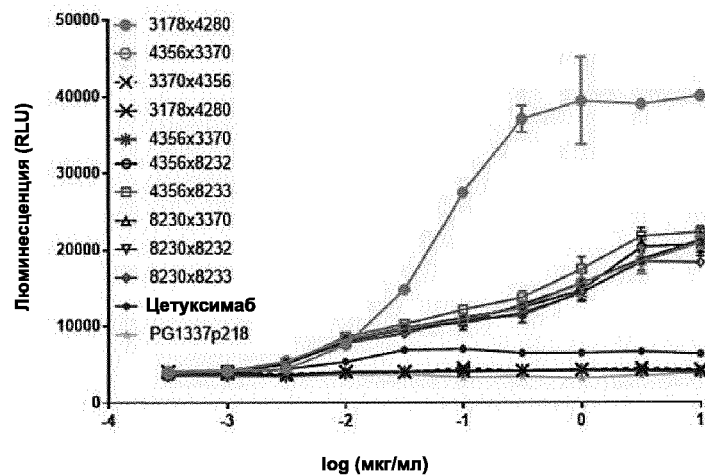
Репортерный анализ на клетках ВхРС-3
Высокая Аффинность



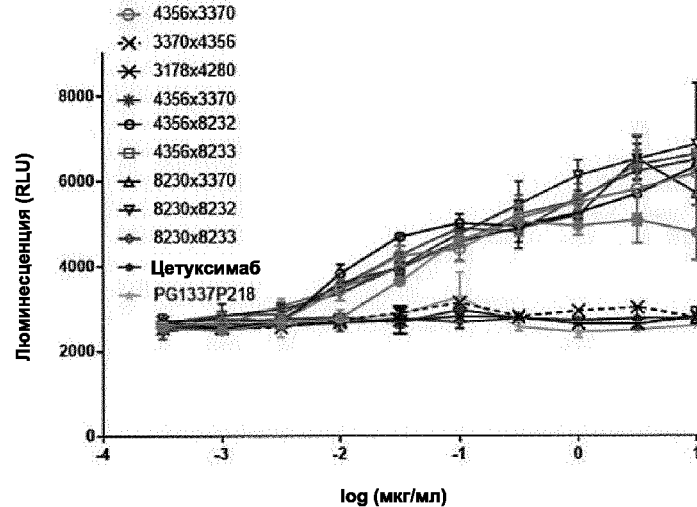
Репортерный анализ на клетках МKN-45
Высокая Аффинность



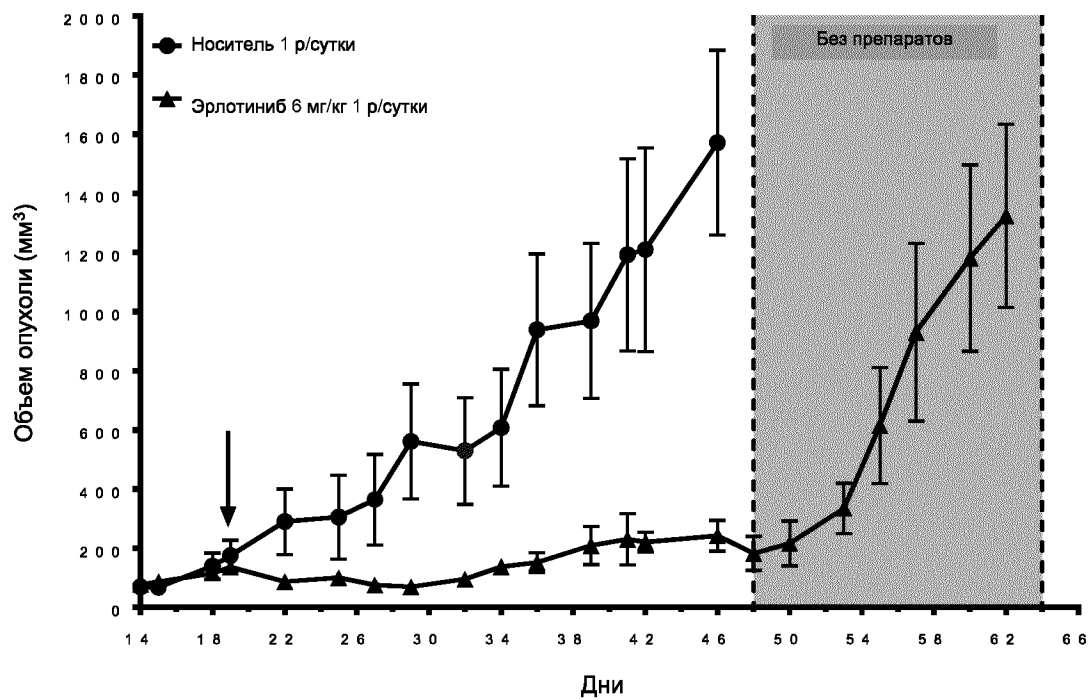
Репортерный анализ на клетках ВхРС-3
Низкая Аффинность



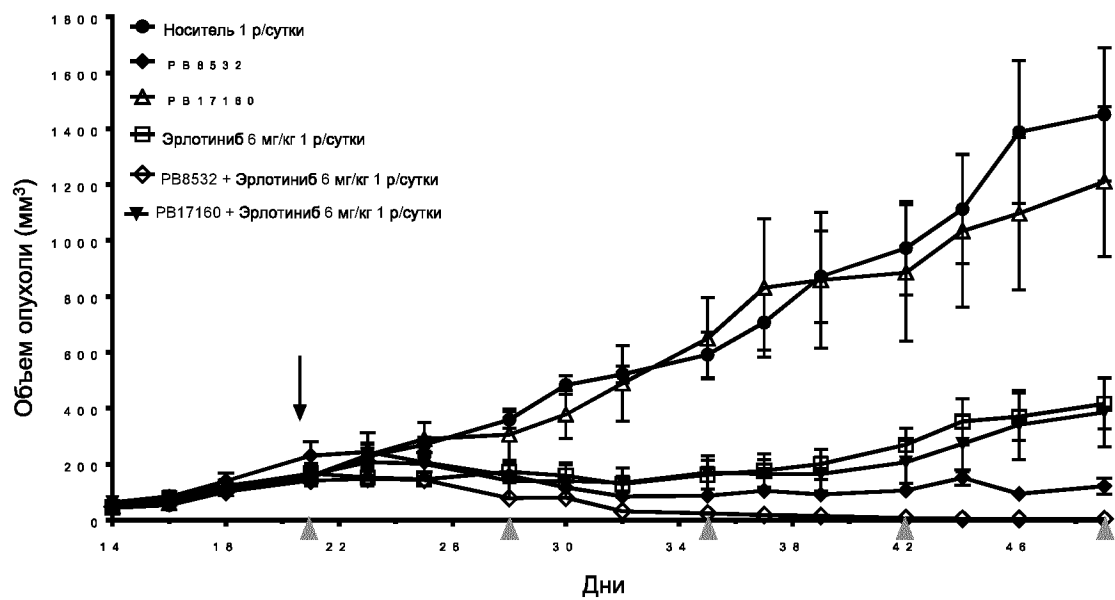
Репортерный анализ на клетках МKN-45
Низкая Аффинность



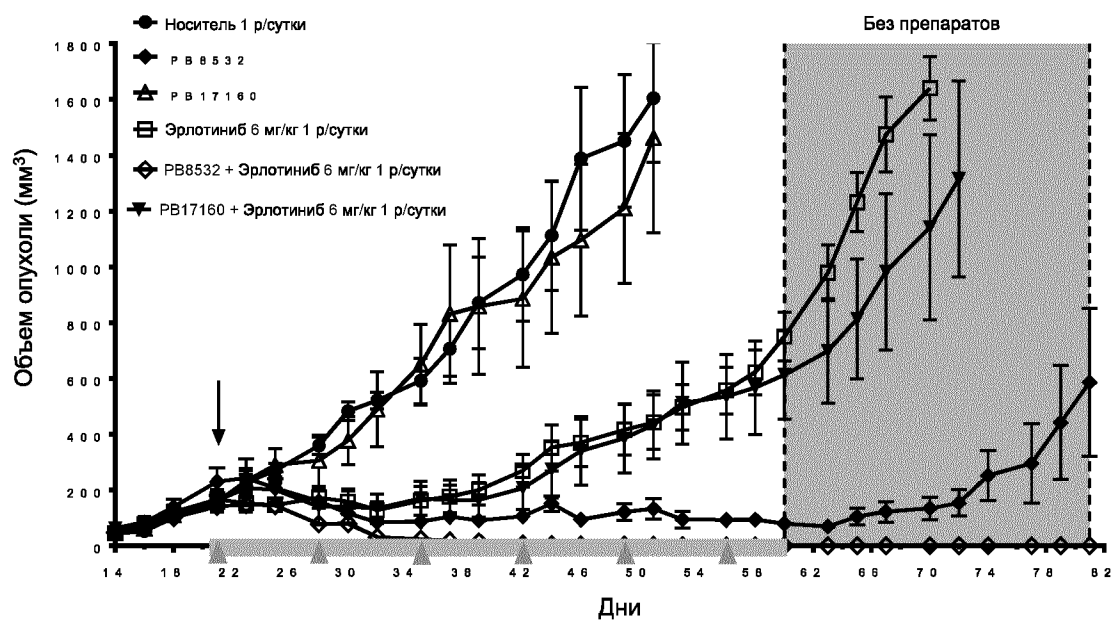
Фигура 19



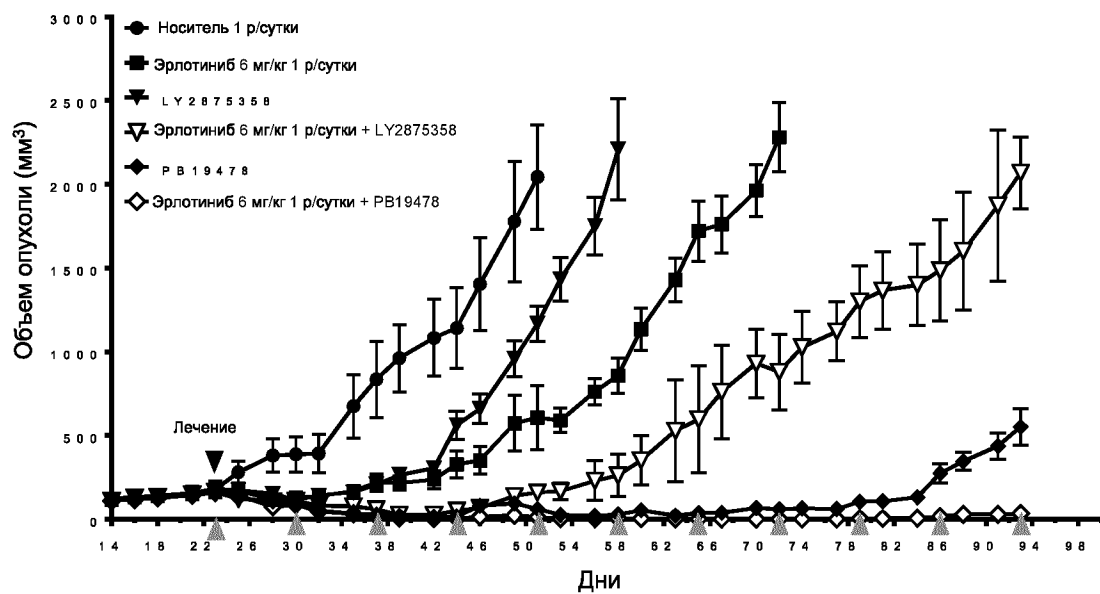
Фигура 20



Фигура 21



Фигура 22



Фигура 23

