

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192089 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.11

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

(22) Дата подачи заявки
2020.02.24

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ И СТРАТИФИКАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРАМ EGFR И c-
Met

(31) 62/810,716; 62/930,190

(72) Изобретатель:
Мурс Шери, Виджаярагхаван Смурти
(US)

(32) 2019.02.26; 2019.11.04

(33) US

(86) PCT/IB2020/051559

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

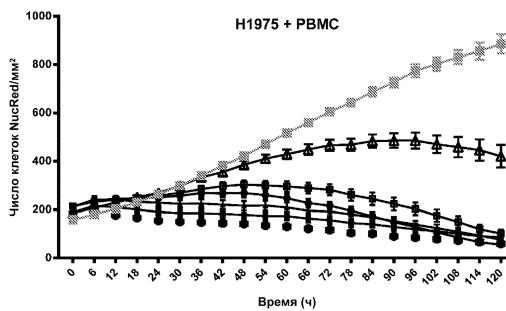
(87) WO 2020/174370 2020.09.03

(88) 2020.12.03

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии и стратификации пациентов с использованием биспецифических антител к рецепторам EGFR/c-Met.

- JNJ-372 50 мкг/мл
- JNJ-372 10 мкг/мл
- JNJ-372 2 мкг/мл
- ◆ JNJ-372 0,02 мкг/мл
- JNJ-372 3,2e-3 мкг/мл
- ▲ JNJ-372 1,28e-4 мкг/мл
- ※ JNJ-372 0 мкг/мл



A1

202192089

202192089

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570139EA/055

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ И СТРАТИФИКАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРАМ EGFR И С-MET

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии и стратификации пациентов с использованием биспецифических антител к рецепторам EGFR/c-Met.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленных через EFS-Web, все содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. Текстовый файл ASCII, созданный 13 февраля 2020 г., назван JBI6051WOPCT1ST25.txt и имеет размер 19 килобайт.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Благодаря тому, что индивидуальные роли рецепторов EGFR и c-Met при онкологических заболеваниях хорошо известны, они представляют собой привлекательные мишени для комбинированной терапии. Оба рецептора передают сигнал через одни и те же пути выживания и антиапоптотические пути (ERK и АКТ); таким образом, совместное ингибирование этой пары может ограничивать потенциал активации компенсаторного пути, тем самым повышая общую эффективность.

Рецидивы или устойчивость к существующим терапевтическим средствам являются обычным явлением. Таким образом, существует потребность в улучшенных терапевтических средствах или комбинации терапевтических средств и биомаркерах стратификации пациентов для разработки более эффективного лечения заболевания, такого как EGFR или c-Met-положительный рак.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем описании предложен способ лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met) в комбинации с агентом, усиливающим активность макрофагов у пациента.

В описании также предложен способ диагностики и лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий: получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения; и введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с

диагностированным ответом на лечение антителом к EGFR/c-Met.

В описании также предложен способ лечения пациента с подозрением на рак или с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, с использованием биспецифического антитела к EGFR/c-Met, включающий: определение того, что уровни макрофагов или моноцитов у пациента выше порогового значения; и введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту, у которого, как определено, уровень макрофагов или моноцитов выше порогового значения.

В описании также предложен способ прогнозирования ответа у пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; прогнозирование у пациента наличия ответа на лечение, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

В описании также предложен способ лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; лечение пациента биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

В описании также предложен способ определения того, отвечает ли пациент с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, и принятия решения о том, следует ли лечить пациента, включающий: получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения, или диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, не отвечающего на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце ниже порогового значения; и введение биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным ответом на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met или отказ от введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным отсутствием ответа на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показано JNJ-372-опосредованное ингибирование пролиферации меченных NucLight Red клеток NCI-H1975 в присутствии РВМС при указанных концентрациях JNJ-372 в культурах в течение до 120 часов при измерении путем подсчета клеток NucLight Red/мм².

На **ФИГ. 2** показано JNJ-372-опосредованное влияние на пролиферацию меченных

NucLight Red клеток NCI-H1975 в отсутствие РВМС при указанных концентрациях JNJ-372 в культурах в течение до 120 часов при измерении путем подсчета клеток NucLight Red/мм².

На **ФИГ. 3** показано ингибирование пролиферации меченных NucLight Red клеток NCI-H1975, опосредованное JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma, JNJ-372.NF или изотипическим контролем, в присутствии РВМС. Пролиферация не ингибировалась ни в отсутствие РВМС, ни контролем изотипа или JNJ-372.IgG2sigma с молчащим Fc-фрагментом. JNJ-372.NF, культивированный в присутствии РВМС, частично ингибировал пролиферацию. Iso: изотипический контроль; IgG2s: JNJ-372.IgG2sigma; EGFRxMet NF: JNJ-372.NF.

На **ФИГ. 4** показан апоптоз клеток NCI-H1975, меченных NucLight Red, опосредованный JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma, JNJ-372.NF или изотипическим контролем, в присутствии РВМС через 48 часов культивирования. Апоптоз не индуцировался в отсутствие РВМС, изотипическим контролем или JNJ372.IgG2sigma с молчащим Fc-фрагментом. JNJ-372.NF, культивируемый в присутствии РВМС, частично опосредовал апоптоз. Iso: изотипический контроль; IgG2s: JNJ-372.IgG2sigma; EGFRxMet NF: JNJ-372.NF.

На **ФИГ. 5** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием системы PeggySue), показывающее белки EGFR, c-Met и pEGFR в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированные в присутствии или в отсутствие РВМС в течение 4, 24, 48 или 72 часов, как показано на Фиг. Наличие РВМС усиливало JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии белков EGFR и c-Met и ингибирование pEGFR.

На **ФИГ. 6** показано относительное количество EGFR (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС в течение 4, 24, 48 или 72 часов, как показано на Фиг. Присутствие РВМС усиливало JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии EGFR.

На **ФИГ. 7** показано относительное количество pEGFR (pY1173) (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС в течение 4, 24, 48 или 72 часов, как показано на Фиг. Наличие РВМС усиливало JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии pEGFR.

На **ФИГ. 8** показано относительное количество c-Met (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС в течение 4, 24, 48 или 72 часов, как показано на Фиг. Присутствие РВМС усиливало JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии c-Met.

На **ФИГ. 9** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), показывающее белки EGFR, c-Met и pEGFR в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в

течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС от семи разных доноров, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 10** показано относительное количество EGFR (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС от семи разных доноров, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 11** показано относительное количество pEGFR (pY1173) (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС от семи разных доноров, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 12** показано относительное количество c-Met (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах NCI-H1975, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС от семи разных доноров, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 13** показана корреляция между процентом (%) моноцитов в образце РВМС каждого донора и процентом (%) изменения ингибирования EGFR JNJ-372 в присутствии РВМС (относительная кратность изменения по сравнению с отсутствием РВМС), измеренная по количеству белка EGFR (нормализованному к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975.

На **ФИГ. 14** показана корреляция между процентом (%) моноцитов в образце РВМС от каждого донора и процентом (%) изменения ингибирования pEGFR Y1173 JNJ-372 в присутствии РВМС (относительная кратность изменения по сравнению с отсутствием РВМС), измеренная по количеству белка pEGFR (нормализованному к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975.

На **ФИГ. 15** показана корреляция между процентом (%) моноцитов в образце РВМС от каждого донора и процентом (%) изменения ингибирования c-Met JNJ-372 в присутствии РВМС (относительная кратность изменения по сравнению с отсутствием РВМС), измеренная по количеству белка c-Met (нормализованного к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975.

На **ФИГ. 16** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, обедненных НК-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 17** показано относительное количество EGFR (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, обедненных НК-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 18** показано относительное количество pEGFR (pY1173)

(нормализованное к актину для контроля нанесения) в NCI-H1975, обработанном JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, обедненных НК-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 19** показано относительное количество с-Met (нормализованное к актину для контроля нанесения) в NCI-H1975, обработанном JNJ-372 или изотипическим контролем, и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, обедненных НК-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 20** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PegggySue), определяющего уровни белка EGFR, с-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, выделенных НК-клеток, выделенных моноцитов, макрофагов M1, MCSF-дифференцированных или GMCSF-дифференцированных макрофагов M1 от того же донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 21** показано относительное количество EGFR (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, моноцитов, MCSF-дифференцированных или GMCSF-дифференцированных макрофагов M1 от того же донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 22** показано относительное количество pEGFR (pY1173) (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, моноцитов, MCSF-дифференцированных или GMCSF-дифференцированных макрофагов M1 от того же донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 23** показано относительное количество с-Met (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, моноцитов, MCSF-дифференцированных или GMCSF-дифференцированных макрофагов M1 от того же донора, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 24** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PegggySue), определяющего уровни белка EGFR, с-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем и культивированных в присутствии макрофагов M1 (M1) или макрофагов M2a (M2a), как показано на Фиг. ISO: изотипический контроль, 372 JNJ-372, IgG2sigma: JNJ-372.IgG2sigma.

На **ФИГ. 25** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PegggySue), определяющего уровни белка EGFR, с-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или

изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие макрофагов M2c (M2c). ISO: изотипический контроль, 372 JNJ-372, IgG2sigma: JNJ-372.IgG2sigma.

На **ФИГ. 26** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met, pEGFR и pMet в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 27** показано относительное количество EGFR (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 28** показано относительное количество pEGFR (pY1173) (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 29** показано относительное количество c-Met (нормализованное к актину для контроля нанесения) в образцах клеточной культуры SNU-5, культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие JNJ-372, изотипического контроля или РВМС, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 30** показано относительное количество pMet (pY1234/1235) (нормализованное к актину для контроля нанесения) в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг.

На **ФИГ. 31** показаны объемы опухолей из подкожно введенной клеточной линии H1975 ксенотрансплантатной опухоли после введения 10 мг/кг изотипического контроля (n=8), JNJ-372 (n=8) или JNJ-372.IgG2sigma (IgG2σ на Фиг.) (n=8) 2 р./нед. в течение 3 недель. % TGI рассчитывали на 24 сутки.

На **ФИГ. 32** показаны объемы опухолей из подкожно введенной клеточной линии H1975 ксенотрансплантатной опухоли после введения несущей среды (PBS) (n=8), 5 мг/кг JNJ-372 (n=8) или JNJ-372.IgG2sigma (IgG2σ на Фиг.) (n=8) 2 р./нед. в течение 3 недель. % TGI рассчитывали на 34 сутки. Данные представлены как среднее значение ± станд. ош. среднего в каждой экспериментальной группе.

На **ФИГ. 33** показаны клетки H1975, нагруженные реагентом BATDA и обработанные в течение 2 часов JNJ-372 в присутствии РВМС, НК-клеток или моноцитов, полученных от того же донора, при соотношениях Е : Т, равных 25 : 1, 5 : 1 и 5 : 1 соответственно, и лизисе ADCC, измеренном по высвобождению европия.

На **ФИГ. 34** показано число связанных с опухолью макрофагов, определенное методом проточной цитометрии с помощью многоцветного клеточного анализа образцов опухоли H1975, полученных через 24 часа после введения двух доз изотипа 10 мг/кг, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma (n=5 мышей на группу лечения), чтобы исследовать

процентную долю (%) макрофагов (CD45+ CD11b+ Ly6G- Ly6C- F4/80+) в опухоли после уменьшения количества при помощи антитела к мышиному CSF1R.

На **ФИГ. 35** показаны объемы опухолей из подкожно введенной клеточной линии H1975 ксенотрансплантатной опухоли после введения 10 мг/кг JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипа (n=8 мышей на группу лечения) 2 р./нед. в течение 3 недель в комбинации с антителом к CSF1R мыши или его изотипическим контролем три раза в неделю для уменьшения количества макрофагов. % TGI рассчитывали на 21 день и ****, значение $p < 0,0001$ рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA на 17 день (все мыши во всех группах исследования).

На **ФИГ. 36** показаны гистограммы, на которых изображена относительная кратность изменения указанных хемокинов и цитокинов, продуцируемых клетками H1975, после 4 часов обработки JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma по сравнению с изотипом в присутствии PBMC.

На **ФИГ. 37** показаны гистограммы, на которых изображена относительная кратность изменения указанных хемокинов и цитокинов, продуцируемых клетками H1975, после 72 часов обработки JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma по сравнению с изотипом в присутствии PBMC.

На **ФИГ. 38** показана относительная кратность изменения продукции MCP-1 клетками H1975, обработанными указанным диапазоном доз JNJ-372 в течение 4 часов, в сравнении с необработанными клетками, в присутствии PBMC (E : T=10 : 1) (первые 5 столбцов слева), NK-клеток (столбцы 6-10 слева) или моноцитов (первые 5 столбцов справа) при соотношении эффектор : мишень 5 : 1 (E : T=5 : 1).

На **ФИГ. 39** показаны кривые зависимости эффекта от дозы на основе MSD анализа цитокинов, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными контролями) уровней MCP-3 при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372 в присутствии PBMC, NK-клеток или моноцитов. Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 40** показана относительная кратность изменения продуцирования IL1-RA (ILRA, показанный на Фиг.) клетками H1975, обработанными указанным диапазоном доз JNJ-372 в течение 4 часов, в сравнении с необработанными клетками, в присутствии PBMC (E: T=10 : 1) (первые 5 столбцов слева), NK-клеток (столбцы 6-10 слева) или моноцитов (первые 5 столбцов справа) при соотношении эффектор : мишень 5 : 1 (E : T=5 : 1).

На **ФИГ. 41** показаны кривые доза-эффект по результатам анализа цитокинов на основе MSD, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными контролями) уровней MIP-1 β при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372 в присутствии PBMC, NK-клеток или моноцитов. Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 42** показаны кривые зависимости эффекта от дозы по результатам MSD анализа цитокинов, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными

контролями) уровней MIP-1 β при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) или изотипического контроля в присутствии макрофагов M1 (M1 macs). Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 43** показаны кривые зависимости эффекта от дозы по результатам анализа цитокинов на основе MSD, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными контролями) уровней MIP-1 β при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) или изотипического контроля в присутствии макрофагов M2 (M2 macs). Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 44** показаны кривые зависимости эффекта от дозы по результатам MSD анализа цитокинов, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными контролями) уровней MIP-1 α при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) или изотипического контроля в присутствии макрофагов M1 (M1 macs). Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 45** показаны кривые зависимости эффекта от дозы по результатам анализа цитокинов на основе MSD, измеряющего кратное изменение (по сравнению с необработанными контролями) уровней MIP-1 α при обработке клеток H1975 с использованием JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) или изотипического контроля в присутствии макрофагов M2 (M2 macs). Серая пунктирная линия указывает на значение необработанного контроля.

На **ФИГ. 46** показана кривая зависимости эффекта от дозы для анализа трогицитоза методом проточной цитометрии, измеряющего процентное содержание (%) метки AF488 в CD11b-положительных макрофагах M1 при опсонизации клеток H1975 меченым изотипом, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) в течение 3 часов. Введение JNJ-372, но не изотипа или IgG2, индуцировало дозозависимый трогицитоз макрофагами M1.

На **ФИГ. 47** показана кривая зависимости эффекта от дозы для анализа трогицитоза методом проточной цитометрии, измеряющим процентное содержание (%) метки AF488 в CD11b-положительных макрофагах M2 при опсонизации клеток H1975 меченым изотипом, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma (IgG2 σ на Фиг.) в течение 3 часов. Введение JNJ-372, но не изотипа или IgG2, индуцировало дозозависимый трогицитоз макрофагами M2.

На **ФИГ. 48** представлены репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения, показывающие трогицитоз макрофагами M2, мечеными FITC-CD11b (меченая плазматическая мембрана макрофагов) и Hoechst (меченые ядра), при совместном культивировании (соотношение E : T=5 : 1) с клетками H1975 NucLight Red, опсонизированными AF647-меченым JNJ-372 (верхняя панель) или JNJ-372.IgG2sigma (нижняя панель) через 11 или 44 минуты после опсонизации. Белыми стрелками показаны события трогицитоза, измеренные по переносу AF647-меченного антитела JNJ-372 из клеток-мишеней в макрофаги M2. При

использовании JNJ-372.IgG2sigma трогоцитоз не наблюдался. Длина линии=20 мкм. М: макрофаг; Т; клетка Н1975.

На **ФИГ. 49** (условные обозначения WOPCT1 показаны серым) показаны репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения, на которой показан трогоцитоз макрофагами М2, меченными FITC-CD11b (меченая плазматическая мембрана макрофагов) и Hoechst (меченые ядра), при совместном культивировании (соотношение Е : Т=5 : 1) с клетками Н1975 NucLight Red, опсонизированными AF647-меченным JNJ-372 (верхняя панель) или JNJ-372.IgG2sigma (нижняя панель) через 77 или 110 минуты после опсонизации. Белыми стрелками показаны события трогоцитоза, измеренные по переносу AF647-меченного антитела JNJ-372 из клеток-мишеней в макрофаги М2. При использовании JNJ-372.IgG2sigma трогоцитоз не наблюдался. Длина линии=20 мкм. М: макрофаг; Т; клетка Н1975.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «А, В или С» следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «А», «В», «С», «А или В», «А или С», «В или С» или «А, В или С».

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста четко не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинацию двух или более клеток и т. п.

Соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к

возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

Переходные термины **«содержащий»**, **«состоящий по существу из»** и **«состоящий из»** предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; то есть (i) термин **«содержащий»**, который является синонимом терминам **«включающий»**, **«содержащий»** или **«характеризующийся»**, является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) **«состоящий из»** исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) **«состоящий по существу из»** ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или этапами «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы **«содержащий»** (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы **«состоящий из»** и **«состоящий по существу из»**.

Термины **«совместное введение»**, **«введение»**, **«введение в комбинации с»**, **«в комбинации с»** и т. п. включают введение выбранных терапевтических агентов или лекарственных препаратов одному пациенту и подразумевают включение схем лечения, в которых терапевтические агенты или лекарственные препараты вводят одним и тем же или разными способами или в одно и то же или в разное время.

Термин **«выделенный»** относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды, полипептидные векторы или вирусы), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин **«выделенное»** относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с более высокой чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

Термины **«лечить»**, **«лечение»** или **«терапия»** заболевания или расстройства, такого как рак, относятся к достижению одной или более следующих целей: уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, замедление нарастания выраженности симптомов, характерных для этого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у пациентов, которые ранее страдали этим расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у пациентов с ранее

проявлявшимися симптомами этого расстройства.

Термины **«предотвращать»**, **«предотвращение»**, **«предупреждение»** или **«профилактика»** заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения у пациента расстройства.

Термины **«постановка диагноза»** или **«диагностирование»** относятся к способам определения того, страдает ли пациент данным заболеванием или состоянием или может ли данное заболевание или состояние развиться в будущем, или может ли пациент ответить на лечение ранее диагностированного заболевания или состояния, т. е. стратификации популяции пациентов по вероятности ответа на лечение. Диагноз, как правило, ставит врач на основании общих указаний по диагностированию заболевания или других критериев, которые указывают на вероятность ответа пациента на конкретное лечение.

Термины **«отвечающий на лечение»**, **«ответ на лечение»** или **«вероятный ответ на лечение»** относятся к любому виду улучшения или положительного ответа на лечение, например ослабление или облегчение одного или более симптомов, смягчение заболевания, стабилизация состояния заболевания (т. е. отсутствие ухудшения), предотвращение распространения заболевания, задержка или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение течения заболевания и ремиссия (частичная или полная), как обнаруживаемая, так и не обнаруживаемая.

Термин **«впервые диагностированный»** относится к пациенту, у которого диагностирован рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, который еще не получал лечения множественной миеломы.

Термин **«терапевтически эффективное количество»** относится к некоторому количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, которые включают в себя, например, улучшенное самочувствие пациента.

Термин **«рефрактерный»** относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин **«рецидивирующий»** относится к повторному возникновению заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения в результате предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин **«пациент»** включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин **«животное»** включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади,

коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «**испытуемый**» и «**пациент**» в настоящем документе применяются взаимозаменяемо.

Термин «**около**» означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин «около» означает «в пределах одного среднеквадратичного отклонения» в соответствии с практикой, принятой в данной области, или «в диапазоне до 5%», в зависимости от того, что больше.

Термин «**рак**» относится к аномальному росту клеток, которые склонны к неконтролируемой пролиферации, а в некоторых случаях к метастазированию (распространению) в другие области тела пациента.

Термин «**рак, экспрессирующий EGFR или c-Met**» относится к раку с обнаруживаемой экспрессией EGFR или c-Met или мутацией или амплификацией EGFR или c-Met. Экспрессию EGFR или c-Met, амплификацию и статус мутации можно обнаруживать известными способами, такими как секвенирование, флуоресцентная гибридизация *in situ*, иммуногистохимический анализ, проточная цитометрия или вестерн-блоттинг.

Термин «**рецептор эпидермального фактора роста**» или «**EGFR**» относится к человеческому EGFR (также известному как HER1 или ErbB1 (Ullrich с соавт., Nature 309:418-425, 1984) с аминокислотной последовательностью, представленной в каталоге базы генетических данных под номером NP_005219), а также к их вариантам природного происхождения.

Термин «**рецептор фактора роста гепатоцитов**» или «**c-Met**» в настоящем документе относится к c-Met человека с аминокислотной последовательностью, представленной в каталоге базы генетических данных под номером: NP_001120972, и ее природными вариантами.

Термины «**биспецифическое антитело к EGFR/c-Met**» или «**биспецифическое антитело против EGFR/c-Met**» относятся к биспецифическому антителу с первым доменом, специфически связывающимся с EGFR, и вторым доменом, специфически связывающимся с c-Met. Домены, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met, как правило, представляют собой пары VH/VL, а биспецифическое антитело к EGFR/c-Met является одновалентным в отношении связывания с EGFR и c-Met.

Термины «**специфическое связывание**», или «**специфически связывает**», или «**связывает**» относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-8} М или менее, например, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как

правило, с K_D , которая по меньшей мере в сто раз ниже его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерять с помощью общеизвестных методов. Однако антитела, которые связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например к такому же антигену от других биологических видов (гомологов), например человека или обезьяны, например *Macaca fascicularis* (яванского макака) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое антитело связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термин «**антитела**» подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п., димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от amino к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «**определяющие комплементарность области (CDR)**» относится к области антител, которые связывают антиген. CDR можно определить с помощью различных схем, например, по Кабат (Wu et al. (1970) *J Exp Med* 132: 211-50) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Чотиа (Chothia et al. (1987) *J Mol Biol* 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996) *J Mol Biol* 263: 800-15). Описано соответствие между различными схемами и нумерациями вариабельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, (2001) *J Mol Biol* 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, http://www_imgt_org). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3»,

«LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин **«антигенсвязывающий фрагмент»** относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают в себя VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047.

Термин **«моноклональное антитело»** относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, а также моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин **«гуманизированное антитело»** относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по

меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело может включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин **«человеческое антитело»** относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело человека содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области антитела человека получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения антител человека и локусов иммуноглобулинов человека, внедрения соматических мутаций или намеренного введения замен в каркасные участки или в CDR, либо и в то, и в другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и международной патентной публикации № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, не подходят под определение «антитела человека».

Термин **«рекомбинантный»** относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, в которых сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин **«биспецифический»** относится к антителу, которое специфически

связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабод) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «**мультиспецифический**» относится к антителу, которое специфически связывает два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабод) или *Pan troglodytes* или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «**макрофаг**» означает клетку миелоидного происхождения. Макрофаги представляют собой крупные лейкоциты, встречающиеся главным образом в соединительной ткани и в кровотоке, а также в тканях или микросреде опухоли. Они поглощают инородные частицы и инфекционные микроорганизмы путем фагоцитоза и обладают способностью к презентации антигена. Неактивированные макрофаги, полученные из предшественников, подвергаются специфической дифференциации в зависимости от локальной тканевой среды. Они реагируют на сигналы окружающей среды в тканях, такие как поврежденные клетки, активированные лимфоциты или микробные продукты, для дифференциации в различные функциональные фенотипы. Например, моноциты в крови могут входить в ткань во время воспаления или повреждения и, в зависимости от локальной микросреды, поляризуются в направлении фенотипа M1 или M2. Макрофагальный фенотип M1 характеризуется выработкой высокого уровня провоспалительных цитокинов, способностью опосредовать резистентность к патогенам, сильными микробицидными свойствами, высокой выработкой реакционноспособных промежуточных соединений азота и кислорода, стимуляцией ответов Th1 и уничтожением патогенов и опухолевых клеток. Напротив, макрофаги M2 характеризуются участием в контроле паразитов, ремоделировании тканей, регулировании иммунитета, стимуляции опухоли и эффективной фагоцитарной активности. Макрофаги M2 дополнительно подразделяются на четыре различных подтипа под названием M2a, M2b, M2c и M2d. Термин «**макрофаг**» включает в себя все подтипы макрофагов.

Термин «**моноцит**» относится к мононуклеарным белым клеткам CD14⁺CD34⁻, принадлежащих к типу лейкоцитов, которые участвуют в механизмах защиты первой линии, и способных дифференцироваться в дендритные клетки или предшественники макрофагов. Моноциты, как правило, перемещаются по кровеносной системе. В ответ на внешние стимулирующие сигналы моноциты секретируют многие цитокины-иммунорегуляторы, перемещаются к участку поражения в ткани или к участку опухоли и дифференцируются в макрофаги. В частности, моноцит экспрессирует повышенные

уровни маркера поверхностного антигена CD14 и может экспрессировать по меньшей мере один биомаркер, выбранный из CD64, CD93, CD180, CD328, CD329 или белка арахисового агглютинина (PNA).

Термин «**усиливать**» или «**индуцировать**» относится к потенцированию одной или более функций или активности макрофагов более чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% статистически значимым образом по сравнению с контролем (*например*, потенцирование в присутствии или отсутствии агента, усиливающего активность макрофагов).

Термин «**усиливает активность макрофагов**» относится к усилению одной или более активности макрофагов, индуцированию фенотипического изменения моноцитов и/или дифференцировке макрофагов моноцитов в макрофаги или активации неактивированных макрофагов.

Термин «**активность макрофагов**» относится к любым функциональным возможностям макрофагов, таким как фагоцитоз, презентация антигена, выработка IL-12, IL-1, TNF α или выработка воспалительных хемокинов, таких как CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CCL22.

Термин «**агент, усиливающий активность макрофагов**» может означать малую молекулу, пептид, олигопептид, полипептид, белок, антитело, синтетическую связывающую молекулу, аптамер, молекулу РНК, молекулу ДНК, олигомер, полимер, липид или липосому. Примеры агентов, усиливающих функцию макрофагов, включают цитокины, хемокины, лиганды рецепторов, распознающих структуры, гормоны, адренергические и холинергические агонисты, жирные кислоты, фосфолипиды, иммуноглобулины или их части, Fc-домены иммуноглобулинов, липополисахариды (ЛПС), лиганды толл-подобного рецептора (TLR), гистамины и лиганды рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом.

Термин «**трогоцитоз**» относится к процессу, который характеризуется переносом части клеточной мембраны из донорской клетки в акцепторную клетку. Типичные акцепторные клетки включают макрофаги и моноциты. Дополнительные акцепторные клетки включают НК-клетки, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки и нейтрофилы. Опосредованный трогоцитозом перенос части клеточной мембраны может включать перенос мембранных белков, например, таких как EGFR или c-Met, или комплексов антитело-антиген, в которых антитело связано с молекулой клеточной поверхности. Опосредованный антителами трогоцитоз может происходить посредством связывания Fc-части антитела с Fc-рецептору (FcR), экспрессированным на акцепторных клетках.

Термин «**трогоцитоз, опосредованный антителами к EGFR/c-Met**» относится к трогоцитозу частей клеточной мембраны, содержащих EGFR и/или c-Met, от донорской клетки к акцепторной клетке, опосредованной антителом к EGFR/c-Met, связанным с мембраной донорской клетки EGFR и/или c-Met.

Термин «**порог**» относится к уровню макрофагов или моноцитов, который соответствует примерно 30-му процентилю или более от значения макрофагов или

моноцитов в биологических образцах, полученных от популяции пациентов с EGFR- или c-Met-положительным раком.

Термин «**агонист**» относится к молекуле, которая при связывании с клеточным белком индуцирует по меньшей мере одну реакцию или тип активности, индуцируемые естественным лигандом белка. Молекула является агонистом, если происходит индукция в по меньшей мере одной реакции или типе активности на по меньшей мере около 20%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% больше, чем в по меньшей мере одной реакции или типе активности в отсутствие агониста (*например*, отрицательный контроль), или когда индукция статистически значима по сравнению с индукцией в отсутствие агониста.

Термин «**антагонист**» или «**ингибитор**» относится к молекуле, которая при связывании с клеточным белком подавляет по меньшей мере одну реакцию или тип активности, индуцируемые естественным лигандом белка. Молекула является антагонистом, если происходит подавление по меньшей мере одной реакции или типа активности на по меньшей мере около 20%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с подавлением по меньшей мере одной реакции или типа активности в отсутствие антагониста (*например*, отрицательный контроль) или когда подавление является статистически значимым по сравнению с подавлением в отсутствие антагониста.

Термин «**ингибитор оси PD-(L)**» относится к молекуле, которая ингибирует сигнализацию PD-1 на нижерасположенных участках. Ингибитор оси PD-(L)1 может представлять собой молекулу, которая связывается с PD-1, PD-L1 или PD-L2.

Термин «**биологический образец**» относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами проб являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитная жидкость, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, синовиальная текучая среда, жидкие растворы, контактировавшие с пациентом или биологическим источником, например среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т. п., биоптаты тканей, биоптаты опухолевых тканей, пробы опухолевых тканей, аспираты, взятые тонкой иглой, ткань после хирургической резекции, культуры органов или культуры клеток.

Термины «**низкофукозный**» или «с низким содержанием фукозы», используемые в заявке, относятся к антителам с содержанием фукозы около 1-15%.

Термины «**нормальнофукозный**» или «с нормальным содержанием фукозы» в настоящем документе относятся к антителам с содержанием фукозы более около 50%, как правило, более около 80% или более около 85%.

Способы по описанию

JNJ-61186372 (JNJ-372) представляет собой биспецифическое антитело к EGFR/с-Met IgG1, описанное в патенте США № 9,593,164. Более ранние исследования показали, что JNJ-372 ингибировал рост и прогрессирование опухоли посредством трех различных механизмов: ингибирования индуцированной лигандом активации посредством блокирования связывания лиганда с каждым рецептором, инактивации рецептора посредством разложения и опосредованного эффекторами Fc уничтожения EGFR- и с-Met-экспрессирующих опухолей посредством ADCC и ADCP (Moore et al., *Cancer Research* 76(13), 2016.; публикация в сети Интернет 23 мая 2016 г.; DOI: 10.1158/0008-5472).

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии того, что взаимодействие JNJ-372 Fc не только опосредует ADCC и ADCP, но также усиливает опосредованное JNJ-372 ингибирование передачи сигналов EGFR/с-Met, и что моноцитов или макрофагов достаточно и они необходимы для опосредованного JNJ-372 противоопухолевого эффекта в результате трогоцитоза.

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, на основании неожиданных результатов, описанных в настоящем документе, можно ожидать, что уровни моноцитов в крови пациента могут положительно коррелировать с уровнями макрофагов в опухолях, что может прогнозировать лучший ответ на лечение JNJ-372. Аналогично можно ожидать, что пробы опухолевой ткани с повышенными уровнями макрофагов или повышенными уровнями FcγRI или FcγRIIIa по данным ИHC или профилей экспрессии иммунного гена будут лучше реагировать на JNJ-372, обеспечивая большее количество взаимодействий иммунных клеток. Кроме того, на основании результатов, описанных в настоящем документе, можно ожидать, что способы обработки, усиливающие активность макрофагов, используемых в комбинации с JNJ-372, будут повышать общую эффективность JNJ-372. Например, лечение GM-CSF будет инициировать дифференцировку циркулирующих моноцитов в связанные с опухолью макрофаги, что может повысить эффективность JNJ-372. Лечение с использованием антител к CD47 может блокировать отрицательное ингибирование макрофагов, таким образом активируя их для повышения активности JNJ-372. Аналогично, ингибирование оси PD-(L)1, ингибирование HDAC или действие как агониста CD11b может сдвигать поляризацию связанных с опухолью макрофагов так, что они становятся более активными и, таким образом, могут синергетически взаимодействовать с JNJ-372 для усиления уничтожения опухоли.

Идентификация этого нового механизма обеспечивает основу, позволяющую отбирать пациентов, более восприимчивых к JNJ-372, для лечения на основании относительного или абсолютного количества моноцитов и/или макрофагов в образце крови или опухоли, а также для методов комбинированного лечения с использованием молекул, усиливающих активность макрофагов в сочетании с JNJ-372.

В настоящем описании предложен способ лечения пациента с раком,

экспрессирующим EGFR или c-Met, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met) в комбинации с агентом, усиливающим активность макрофагов у пациента.

В описании также предложен способ диагностики и лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий: получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения; и введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным ответом на лечение антителом к EGFR/c-Met.

В описании также предложен способ лечения пациента с подозрением на рак или с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, с использованием биспецифического антитела к EGFR/c-Met, включающий: определение того, что уровни макрофагов или моноцитов у пациента выше порогового значения; и введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту, у которого, как определено, уровень макрофагов или моноцитов выше порогового значения.

В описании также предложен способ прогнозирования ответа у пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; прогнозирование у пациента наличия ответа на лечение, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

В описании также предложен способ лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; лечение пациента биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

В описании также предложен способ определения того, отвечает ли пациент с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, и принятия решения о том, следует ли лечить пациента, включающий: получение биологического образца от пациента; измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце; диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения, или диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR или c-Met, не отвечающего на лечение биспецифическим

антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце ниже порогового значения; и введение биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным ответом на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met или отказ от введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным отсутствием ответа на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met.

«Уровень» макрофагов или моноцитов может быть качественным (например, присутствие или отсутствие) или количественным (например, абсолютное количество клеток, относительное количество, процент (%) от общего количества клеток или % положительных клеток в поле). В некоторых вариантах осуществления изобретения макрофаги или моноциты отсутствуют в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов превышает среднее значение макрофагов или моноцитов, наблюдаемое в биологическом образце, полученном от здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 30-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR- или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 35-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR- или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 40-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 45-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR- или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 50-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR- или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 60-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 65-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 70-му перцентилю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно

75-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 80-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 85-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 90-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 95-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень макрофагов или моноцитов соответствует примерно 100-му перцентиллю количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR или c-Met-положительным раком.

Уровень макрофагов или моноцитов у пациентов с раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, также можно сравнить с уровнями макрофагов или моноцитов в биологических образцах от здоровых испытуемых. Повышенный уровень макрофагов или моноцитов может быть, например, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4 раза, примерно в 5 раз, примерно в 5,5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 6,5 раз, примерно в 7 раз, примерно в 7,5 раз, примерно в 8 раз, примерно в 8,5 раз, примерно в 9 раз или примерно в 10 раз выше по сравнению с уровнями макрофагов или моноцитов в биологических образцах от здоровых испытуемых.

Макрофаги можно идентифицировать, например, из биоптата опухолевой ткани, полученного от пациентов с экспрессирующей EGFR или c-Met опухолью, с помощью иммуногистохимического анализа с использованием CD68, iNOS (индуцируемая синтаза оксида азота) и CD163 в качестве маркеров макрофагов в целом, макрофагов M1 или M2 макрофагов, соответственно, и оценки процентной доли площади положительного окрашивания и сравнения с неопухолевой тканью (см., например, *Almatoodi с соавт., Cancer Micromedium 9:1-11, 2016*, где описано, что % площади положительного окрашивания CD68 в неопухолевой ткани вдвое выше по сравнению с аденокарциномой, плоскоклеточной или крупноклеточной карциномой). Макрофаги можно идентифицировать, например, из биоптата опухолевой ткани, полученного от пациентов с экспрессирующей EGFR или c-Met опухолью, с помощью профиля экспрессии иммунного гена.

Моноциты можно идентифицировать по образцам крови пациентов с

экспрессирующими EGFR или c-Met опухолями с помощью флуоресцентной сортировки клеток с использованием маркера моноцитов CD14.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой биоптат опухолевого образования.

Аналогичным образом, концентрации FcγRI или FcγRIIIa можно использовать для прогнозирования ответа пациента на терапию JNJ-372, обеспечивая большее количество взаимодействий иммунных клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация FcγRI или FcγRIIIa превышает среднее значение концентрации FcγRI или FcγRIIIa, наблюдаемой в биологическом образце, полученном от здорового испытуемого. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 30-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 35-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 40-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 45-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 50-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 60-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 65-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 70-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 75-му перцентилю уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или c-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 80-му

процентилею уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или с-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 85-му процентилею уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или с-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 90-му процентилею уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или с-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 95-му процентилею уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или с-Met-положительным раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень FcγRI или FcγRIIIa соответствует примерно 100-му процентилею уровня FcγRI или FcγRIIIa в биологических образцах, полученных от пациентов с EGFR-или с-Met-положительным раком.

Концентрацию FcγRI или FcγRIIIa можно измерить с помощью иммуногистохимического анализа образцов опухолевой ткани (таких как свежие замороженные или залитые парафином срезы опухолевой ткани). Концентрацию FcγRI или FcγRIIIa можно выразить в процентах (%) клеток FcγRI или FcγRIIIa в поле микроскопа. Концентрацию FcγRI или FcγRIIIa также можно измерять на уровне экспрессии генов с использованием РНК, выделенной из образцов опухолевой ткани, либо как часть панели сигнатур иммунных генов, либо как часть отдельных генов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который связывает EGFR, содержащий определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; и второй домен, который связывает с-Met, содержащий HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12:

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый домен, который связывает EGFR, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 13 и вариабельный домен легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14; и второй домен, который связывает с-Met, содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1. Некоторые вариации существуют в пределах константного домена IgG1 (*например*, хорошо известные аллотипы) с вариациями в положениях 214, 356, 358, 422, 431, 435 или 436 (нумерация остатков в соответствии с нумерацией EU) (см., например, веб-ресурсы IMGT; репертуар IMGT (IG и TR); белки и аллели; аллотипы). Биспецифическое антитело к EGFR/c-Met, может относиться к любому аллотипу IgG1, например G1m17, G1m3, G1m1, G1m2, G1m27 или

G1m28.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 17, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 19 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 20:

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой GM-CSF, антагонист CD47, антитело к CD47, ингибитор HDAC, ингибитор оси PD-(L)1 или агонист CD11b.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, является антагонистом CD47.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой антитело к CD47.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой ингибитор HDAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой ингибитор оси PD-(L)1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, усиливающий активность макрофагов, является агонистом CD11b.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор HDAC представляет собой ингибитор HDAC2.

Типичными антагонистами CD47 являются слияния лиганд CD47-Fc, такие как слияния SIRP α -Fc, например, антитело TTI621 и антитело к CD47.

Примерами антител к CD47 являются Nu5F9-G4, TI-061, TTI-622, AO-176, IBI-188, ALX-148, SRF-231, CC-90002, а также описанные в международной патентной публикации № WO2016/081423.

Примерами ингибиторов HDAC являются вориностат, ромидезин, хидамид, панобиностат, белиностат, прациностат, абексиностат, энтиностат, вафидемстат, GSK-2879552, риколиностат, иададемстат, доматиностат, ресминостат, AZD-9468, нанатиностат, CG-200745, моцетиностат, INCB-59872, IMG-7289, тиностамустин, RDN-929, YM-753, HG-146, NBM-BMX, TAK-418, секлидемстат, CKD-504, CKD-506, CC-90011, KA-2507 и цитарриностат.

Примерами ингибиторов оси PD-(L)1 являются антитела, связывающиеся с PD-1, такие как ниволумаб (OPDIVO®), пембролизумаб (KEYTRUDA®), синтилимаб, цемипликамаб (LIBTAYO®), триполимаб, тиснолизумаб, спартализумаб, камрелизумаб, достралимаб, генолимзумаб или цетрелимаб, или антитела, связывающиеся с PD-L1, такие как антитела к PD-L1, например, энвафолимаб, атезолизумаб (TECENTRIQ®), дурвалумаб (IMFINZI®) и авелумаб (BAVENCIO®).

Антитела можно приобрести через уполномоченного дистрибьютора или аптеки.

Структуры аминокислотных последовательностей малых молекул можно найти в документах USAN и/или INN из реестра CAS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или с-Met, связан с EGFR «дикого» типа (без мутаций), активирующей мутацией гена EGFR, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, с-Met «дикого» типа, активирующей мутацией гена с-Met, амплификацией гена с-Met или мутацией KRAS.

Примеры активирующих мутаций гена EGFR, которые могут быть связаны с раком, включают точечные мутации, делеционные мутации, инсерционные мутации, инверсии или амплификации генов, которые приводят к увеличению по меньшей мере одной биологической активности EGFR, такой как повышенная тирозинкиназная активность, образование гомодимеров и гетеродимеров рецепторов, усиленное связывание с лигандом и т. д. Мутации могут быть локализованы в любой части гена EGFR или регуляторной области, связанной с геном EGFR, и включать мутации в экзоне 18, 19, 20 или 21 или мутации в киназном домене. Другие примеры активирующих EGFR мутаций известны в данной области (см. патентная публикация США № US2005/0272083). Информация о EGFR и других рецепторах ErbB, включая гомо- и гетеродимеры рецепторов, лиганды рецепторов, сайты аутофосфорилирования и сигнальные молекулы, участвующие в опосредованной ErbB передаче сигналов, известна в данной области (см. Hynes и Lane, *Nature Reviews Cancer* 5: 341-354, 2005).

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая мутация гена EGFR представляет собой замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746-A750, делецию R748-P753, инсерцию Ala (A) между M766 и A767, инсерцию Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, инсерцию Asn и Ser (NS) между P772 и H773, инсерцию одной или более аминокислот между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, или одну или более делеций или одну и более инсерций в экзоне 20 EGFR.

Примеры активирующих мутаций гена с-Met включают точечные мутации, мутации в форме делеции, инсерционные мутации, инверсии или амплификации генов, которые приводят к увеличению по меньшей мере одной биологической активности белка с-Met, такой как повышенная тирозинкиназная активность, образование гомодимеров и гетеродимеров рецепторов, усиленное связывание с лигандом и т. п. Мутации могут быть расположены в любой части гена с-Met или регуляторных участках, связанных с геном, например, мутации в киназном домене с-Met. Примеры активирующих с-Met мутаций представляют собой мутации по положениям остатков N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 и E168. Способы обнаружения мутаций или амплификаций генов EGFR и с-Met общеизвестны.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный ген KRAS имеет замену G12V, G12C или G12A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента впервые диагностирован рак, экспрессирующий EGFR или c-Met.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с впервые диагностированным раком, экспрессирующим EGFR или c-Met, имеет одну или более мутаций в экзоне 20 EGFR. Мутации в экзоне 20 (инсерция одной или более аминокислот по существу устойчива к ингибиторам тирозинкиназы (TKI) EGFR (см. международную патентную публикацию № WO2018/094225).

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается рецидив или рефрактерность к лечению предшествующим противораковым терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предшествующая противораковая терапия представляет собой химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент является резистентным или приобрел резистентность к ингибитору EGFR. Примерами ингибиторов EGFR, к которым рак может приобрести резистентность, являются антитела к EGFR цетуксимаб (ERBITUX®), пантинумумаб (VECTIBIX®), матузумаб, нимотузумаб, низкомолекулярные ингибиторы EGFR эрлотиниб (TARCEVA®), gefитиниб (IRESSA®), ЕКВ-569 (пелитиниб, необратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR), пан-ErbB и другие ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, лапатиниб (ингибитор EGFR и HER2), пелитиниб (ингибитор EGFR и HER2), вандетаниб (ZD6474, ZACTIMA™, EGFR, ингибитор тирозинкиназы VEGFR2 и RET), PF00299804 (дакомитиниб, необратимый ингибитор тирозинкиназы пан-ErbB), CI-1033 (необратимый ингибитор тирозинкиназы пан-erbB), афатиниб (BIBW2992, необратимый ингибитор тирозинкиназы пан-ErbB), AV-412 (двойной ингибитор EGFR и ErbB2), EXEL-7647 (ингибитор EGFR, ErbB2, GEVGR и EphB4), CO-1686 (необратимый мутант-селективный ингибитор тирозинкиназы EGFR), AZD9291 (необратимый мутант-селективный ингибитор EGFR) и HKI-272 (нератиниб, необратимый ингибитор EGFR/ErbB2).

Для определения того, имеет ли пациент резистентность, приобретенную резистентность или предрасположенность к приобретению резистентности к противораковой терапии, можно использовать различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью к

противораковой терапии, включают ухудшение или отсутствие улучшения состояния здоровья пациента, увеличение размера опухоли, прекращение или замедление торможения роста опухоли и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Показателем того, что у пациента развилась резистентность или имеется предрасположенность к развитию резистентности к противораковой терапии, также может быть повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных с раком, таких как анорексия, когнитивные расстройства, депрессия, одышка, утомляемость, гормональные нарушения, нейтропения, боль, периферическая нейропатия и половая дисфункция. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьировать в зависимости от типа ракового заболевания. Например, симптомы, связанные с раком шейки матки, могут включать аномальное кровотечение, атипичные обильные влагалищные выделения, тазовую боль, не связанную с нормальным менструальным циклом, боль в мочевом пузыре или боль при мочеиспускании, кровотечение в период между регулярными менструальными периодами, боль после полового акта, вагинального душа или обследования тазовых органов. Симптомы, связанные с раком легких, могут включать устойчивый кашель, откашливание крови, нехватку дыхания, дыхание с присвистом и болью в груди, потерю аппетита, потерю массы тела без стремления к похудению и утомляемость. Симптомы рака печени могут включать потерю аппетита и веса, боль в животе, особенно в верхней правой части живота, которая может отдавать в спину и плечо, тошноту и рвоту, общую слабость и усталость, увеличение печени, вздутие живота (асцит) и желтую окраску кожи и белков глаз (желтуха). Специалист-онколог может легко идентифицировать симптомы, связанные с конкретным типом рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой эпителиально-клеточный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, рак влагалища, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой эпителиально-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой рак яичника. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак,

осуществления изобретения рак, экспрессирующий EGFR или c-Met, представляет собой спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения НМРЛ включает плоскоклеточную карциному, аденокарциному и крупноклеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки НМРЛ имеют эпителиальный фенотип. В некоторых вариантах осуществления изобретения НМРЛ имеет приобретенную резистентность к лечению одним или более ингибиторами EGFR.

В НМРЛ конкретные мутации гена EGFR связаны с высокой частотой ответа (70-80%) на ингибиторы тирозинкиназы EGFR (EGFR-ТКИ). Делеция аминокислот 5 в экзоне 19 или точечная мутация L858R в EGFR связаны с чувствительностью к EGFR-ТКИ (Nakata и Gotoh, *Expert Opin Ther Targets* 16: 771-781, 2012). Данные мутации приводят к лиганд-независимой активации киназной активности EGFR. Активирующие мутации гена EGFR наблюдаются у 10-30% пациентов с НМРЛ, и они значительно чаще встречаются у испытуемых восточно-азиатского происхождения, женщин, никогда не куривших лиц, и пациентов с гистологией аденокарциномы (Janne и Johnson *Clin Cancer Res* 12(14 Suppl): 4416s-4420s, 2006). Амплификация гена EGFR также сильно коррелирует с ответом после лечения EGFR-ТКИ (Cappuzzo *с соавт.*, *J Natl Cancer Inst* 97:643-55, 2005). Вставки в экзоне 20 EGFR связаны с резистентностью к ТКИ EGFR.

Хотя большинство пациентов с НМРЛ с мутациями EGFR изначально отвечают на терапию ТКИ EGFR, практически у всех развивается резистентность, предотвращающая устойчивый ответ. У 50-60% пациентов развивается резистентность из-за точечной мутации во втором сайте киназного домена EGFR (T790M). Почти 60% всех опухолей, ставших резистентными к ингибиторам тирозинкиназы EGFR, увеличивают экспрессию c-Met, амплификацию гена c-Met или увеличивают его единственный известный лиганд HGF (Turke *с соавт.*, *Cancer Cell*, 17:77-88, 2010).

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16.

Пациент, гомозиготный по фенилаланину в положении 158 в CD16, имеет генотип FcγRIIIa-158F/F. Пациент, гетерозиготный по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16, имеет генотип FcγRIIIa-158F/V. CD16 также известен как Fc-гамма-рецептор IIIa (FcγRIIIa) или изоформа рецептора III-A гамма-области Fc-области низкоаффинного иммуноглобулина. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в положении остатка 158 белка FcγRIIIa влияет на аффинность FcγRIIIa к IgG человека. Рецептор с полиморфизмами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V демонстрирует сниженное взаимодействие с Fc и, таким образом, сниженную ADCC по сравнению с FcγRIIIa-158V/V. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах человека повышает способность антител индуцировать ADCC вследствие улучшенного связывания антител с FcγRIIIa (CD16) человека (Shields et al., *J Biol Chem*

277:26733-40, 2002).

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met имеет сниженное содержание фукозы в диапазоне от приблизительно 1% до приблизительно 10%. Биспецифическое антитело к EGFR/c-Met, имеющее сниженное содержание фукозы, может быть более эффективным при лечении пациентов с генотипами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V. Пациенты могут быть проанализированы на полиморфизм FcγRIIIa с помощью стандартных способов.

Антитела с пониженным содержанием фукозы могут быть получены с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антеннального комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno *с соавт.*, Cytotechnology 64:(249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields *с соавт.*, J Biol Chem 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier *с соавт.*, MAbs;2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение в качестве линии клеток-хозяев гибридной клеточной линии крысы YB2/0 (Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент дополнительно получает третью противораковую терапию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения третья противораковая терапия представляет собой химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор c-Met. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор HER2. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор HER3. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор HER4. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор VEGFR. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой ингибитор AXL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы

представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой gefитиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой лапатиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой вандетаниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой афатиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой осимертиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой лазертиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой позитиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой криотитиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой кабозантиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой капматиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой акситиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ленватиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой нинтеданиб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой регорафениб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой пазопаниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой сорафениб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой сунитиниб.

Противораковые терапии, которые можно использовать в комбинации с биспецифическим антителом к EGFR/c-Met в способах настоящего описания, включают в себя любое одно или более из химиотерапевтических лекарственных препаратов или других противораковых терапевтических агентов, известных специалистам в данной области. Химиотерапевтические агенты представляют собой химические соединения, подходящие для лечения рака, и включают ингибирующие рост или другие цитотоксические агенты и включают алкилирующие агенты, антиметаболические средства, ингибиторы микротрубочек, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ингибиторы роста сосудов и т. п. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамида, триэтилентиофосфорамида и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как

аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомиицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиандрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митоган, трилостан; добавки для восполнения дефицита фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; представители семейства таксоидов или таксанов, такие как паклитаксел (ТАКСОЛ®) доцетаксел (ТАКСОТЕР®) и их аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДФМО); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и/или ангиогенеза, включая сорафениб (NEXAVAR®), сунитиниб (SUTENT®), пазопаниб (VOTRIENT™), тоцераниб (PALLADIA™), вандетиниб (ZACTIMA™), цедираниб (RECENTIN®), регорафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестауртиниб (CEP-701), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA®), афатиниб (BIBW 2992), лапатиниб (TYKERB®), нератиниб (NKI-272) и т. п. и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых указанных выше соединений. Также данное определение включает антигормональные агенты, действие которых состоит в регуляции или ингибировании действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически

приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленного выше. Другие традиционные химические соединения цитотоксического действия, раскрытые в Wiemann et al., 1985, in *Medical Oncology* (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

Введение

Биспецифическое антитело к EGFR/c-Met и активирующий макрофаги агент можно вводить пациенту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят перед введением агента, активирующего макрофаги.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят после введения активирующего макрофаги агента.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят одновременно с введением активирующего макрофаги агента.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят перед введением третьего противоракового агента.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят после введения третьего противоракового агента.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят одновременно с введением третьего противоракового агента.

Промежуток времени между введениями биспецифического антитела к EGFR/c-Met и активирующего макрофаги агента или третьей противораковой терапии может составлять несколько минут, например, 1, 2, 5, 10, 30 или 660 минут или несколько часов, например, приблизительно 2, 4, 6, 10, 12, 24 или 36 часов или, например, приблизительно 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 дней или более.

Биспецифическое антитело к EGFR/c-Met и агент, активирующий макрофаги, или третий противораковый агент можно вводить в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, для получения биспецифического антитела к EGFR/c-Met можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% глицин. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Для твердых пероральных препаратов, таких как порошки, капсулы и таблетки, приемлемые носители и добавки включают крахмалы, сахара, разбавители, гранулообразующие агенты, смазывающие вещества, связующие вещества, агенты для улучшения распадаемости таблеток и т. п. Твердые пероральные препараты также могут быть покрыты оболочками из таких веществ, как сахар, или иметь

кишечнорастворимое покрытие, чтобы модулировать основное место всасывания. Для парентерального введения носитель, как правило, состоит из стерильной воды, а для улучшения растворимости или консервации можно добавлять другие вспомогательные вещества. Суспензии или растворы для введения путем инъекции можно также получать с использованием водных носителей вместе с соответствующими добавками. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация биспецифического антитела к EGFR/c-Met и агента, активирующего макрофаги, в фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15%, 20%, 30%, 40% или 50% масс., и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т. д. в соответствии с выбранным способом введения. Фармацевтические композиции в твердых формах могут содержать от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 2000 мг, например, приблизительно 1 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 500 мг приблизительно 600 мг или приблизительно 1000 мг активного ингредиента.

Способом введения ингибитора может быть любой подходящий путь доставки антитела испытуемому, такой как парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное, внутривенное или подкожное, легочное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравaginaльное, ректальное введение) с использованием такой лекарственной формы, как таблетки, капсулы, растворы, порошки, гели, гранулы; и введение антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством доставки в опухоль, в сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Создание биспецифических антител к EGFR/c-Met, используемых в способах изобретения

Примером антитела к EGFR/c-Met, которое можно применять в способах изобретения, является JNJ-372. JNJ-273 характеризуется следующими аминокислотными последовательностями:

Плечо, связывающее EGFR

> SEQ ID NO: 1 (HCDR1; плечо, связывающее EGFR)

TYGMH

> SEQ ID NO: 2 (HCDR2; плечо, связывающее EGFR)

VIWDDGSYKYYGDSVKG

> SEQ ID NO: 3 (HCDR3; плечо, связывающее EGFR)

DGITMVRGVMKDYFDY

> SEQ ID NO: 4 (LCDR1; плечо, связывающее EGFR)

RASQDISSALV

> SEQ ID NO: 5 (LCDR2; плечо, связывающее EGFR)

DASSLES

> SEQ ID NO: 6 (LCDR3; плечо, связывающее EGFR)

QQFN SYPLT

> SEQ ID NO: 7 (HCDR1; плечо, связывающее c-Met)

SYGIS

> SEQ ID NO: 8 (HCDR2; плечо, связывающее c-Met)

WISAYNGYTNYAQKLQG

> SEQ ID NO: 9 (HCDR3; плечо, связывающее c-Met)

DLRGTYFDY

> SEQ ID NO: 10 (LCDR1; плечо, связывающее c-Met)

RASQGISNWLA

> SEQ ID NO: 11 (LCDR2; плечо, связывающее c-Met)

AASSLLS

> SEQ ID NO: 12 (LCDR3; плечо, связывающее c-Met)

QQANSFPIT

> SEQ ID NO: 13 (VH; плечо, связывающее EGFR)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
DDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK
DYFDYWGQGLTVTVSS

> SEQ ID NO: 14 (VL; плечо, связывающее EGFR)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFGSGESGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGGTKVEIK

> SEQ ID NO: 15 (VH; плечо, связывающее c-Met)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYGISWVRQAPGHGLEWGMGWSA
YNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTYFDYW
GQGLTVTVSS

> SEQ ID NO: 16 (VL; плечо, связывающее c-Met)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLL
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIK

> SEQ ID NO: 17 HC1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
DDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK
DYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 18 LC1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS
TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 19 HC2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISA
YNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYW
GQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 20 LC2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLL
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS
STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

В способах настоящего описания также можно использовать другие биспецифические антитела к EGFR/c-Met, если они демонстрируют аналогичные характеристики при сравнении с JNJ-372, как описано в патенте США № 9,593,164. Биспецифические антитела к EGFR/c-Met, которые можно применять в способах настоящего описания, также можно создавать методами комбинирования EGFR-связывающих доменов VH/VL и c-Met-связывающих доменов VH/VL, которые являются общедоступными, а исследования полученных биспецифических антител на предмет их характеристик можно выполнять, как описано в патенте США № 9,593,164.

Биспецифические антитела к EGFR/c-Met, используемые в способах настоящего описания, можно получить, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена

полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на EGFR и эпитопом на c-Met. Например, биспецифические антитела по изобретению могут быть получены с использованием технологии, описанной в международных патентных публикациях № WO2011/131746. В случае антител IgG1 можно применять мутации F405L в одной тяжелой цепи и K409R в другой тяжелой цепи. Для антител IgG2 можно применять IgG2 дикого типа и антитело IgG2 с заменами F405L и R409K. Для антител IgG4 можно применять IgG4 дикого типа и антитело IgG4 с заменами F405L и R409K. Для создания биспецифических антител конструируют первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело так, чтобы в области Fc они имели вышеупомянутую мутацию; антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирных областях могли подвергаться изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °С в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне рН 5-8, например при рН=7,0 или при рН=7,4.

Биспецифические антитела к EGFR/c-Met, используемые в способах настоящего описания, можно также получать с применением таких конфигураций, как «выступ во впадину» (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатическое соответствие (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), доменное антитело, сконструированное посредством обмена цепей (SEEDbody) (EMD Serono) и Biclonic

(Merus).

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию No. WO 2006/028936) выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СН3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СН3, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СН3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СН3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СН3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Технология CrossMAb, в дополнение к использованию стратегии «выступ во впадину» для промотирования обмена Fab-плеча, использует замену домена СН1/CL в одной половине плеча, чтобы гарантировать правильное спаривание легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8242247).

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению могут применяться другие стратегии перенаправления посредством обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или внутри тяжелой цепи в биспецифических антителах (либо в одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, СН3 с CL и СН3 с СН1, как описано в патентных публикациях № WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 и WO2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СН3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СН3, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать посредством следующих замен (указаны модифицированные положения в первом СН3-домене первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором СН3-домене второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной

публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

Для получения биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US20070287170.

Как правило, мутации получают на уровне ДНК в молекуле, такой как константный домен антитела, с помощью стандартных способов.

Далее настоящее изобретение будет описано со ссылкой на приведенные ниже конкретные примеры, не имеющие ограничительного характера.

Материалы и способы

PBMC и выделение NK-клеток и моноцитов из PBMC

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и выделенные иммунные клетки (NK-клетки и моноциты) приобретали в компании Nemascare. PBMC были выделены из лейкопаков, собранных в центрах NemaCare, зарегистрированных в FDA, в соответствии с инструкциями по сбору cGMP и cGTP от IRB с согласия здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), очищенные центрифугированием в градиенте плотности, приобретали у NemaCare в криоконсервированном формате и хранили в жидком азоте до использования.

Для некоторых доноров лейкопаки были разделены 3 способами, чтобы выделить PBMC, NK-клетки и моноциты из одного и того же донорского лейкопака. NK-клетки выделяли с использованием CD56-отрицательной селекции, а моноциты выделяли с использованием CD14-отрицательной селекции. Выделенные NK-клетки и моноциты приобретали у компании Nemascare в криоконсервированном формате и хранили в жидком азоте до применения.

Дифференцировка моноцитов в макрофаги M1, M2a и M2c

Моноциты (приобретенные у компании Nemascare) размораживали в среде XVIVO 15 с добавлением 10% FBS и высевали в обработанные флаконы T75 для культуры тканей. В день 0 моноциты высевали в среду с 50 нг/мл M-CSF (№ по кат. 216-MC-025/CF производства R&D systems) с получением макрофагов M0. Для поляризации макрофагов M0 в макрофаги M2a в день 5 среду заменяли на 50 нг/мл M-CSF и 20 нг/мл IL-4 (№ по кат. 204-IL-020/CF, R&D systems) и 20 нг/мл IL-13 (№ по кат. 213-ILB-025/CF, R&D systems) и инкубировали в течение 48 часов. Чтобы поляризовать макрофаги M0 в макрофаги M2c, в день 5 среду заменяли на 50 нг/мл M-CSF и 20 нг/мл IL-10 (№ по кат. 217-IL-025/CF, R&D systems) и инкубировали в течение 48 часов. Для получения макрофагов M1 в день 6 среду заменяли на 50 нг/мл M-CSF и 100 нг/мл IFN-g (№ по кат. 285-IF-100/CF, R&D systems) и инкубировали 24 часа. Дифференцированные макрофаги M1, M2a и M2c затем удаляли из флакона с помощью аккутазы и использовали для анализа.

Уменьшение количества NK-клеток и моноцитов в PBMC

Количество НК-клеток уменьшали с использованием набора EasySep Human CD56 Positive Selection kit II (кат. № 17855) от STEMCell Technologies, а количество моноцитов уменьшали с использованием набора EasySep Human CD14 Positive Selection kit II (кат. № 17858) от STEMCell Technologies. РВМС (приобретенные у компании Hemacare) размораживали в среде X-VIVO-15 с 10% FBS и подсчитывали. РВМС (10 млн клеток на деплецию) ресуспендировали в буфере EasySep при желаемой концентрации 100 млн клеток/мл. Количество НК-клеток и моноцитов уменьшали в соответствии с протоколом производителя. Добавляли 50 мкл соответствующей смеси для отбора соответствующих антител и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Магнитные частицы встряхивали в течение 30 сек на "вортексе" и добавляли 50 мкл к смеси РВМС+антитело. Смесь инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре и доводили объем до 2,5 мл буфером EasySep. Пробирки затем помещали в магнит EasySep Magnet (№ по кат. 18000, STEMCell Technologies) и инкубировали в течение 3 мин. Затем надосадочную жидкость осторожно переносили в новую пробирку. Этап магнитного разделения повторяли дважды для получения РВМС с уменьшенным количеством НК-клеток и моноцитов. Деплецию проверяли с помощью проточной цитометрии (как описано ниже), и эти РВМС затем использовали для анализа Simple Western, чтобы определить уровни белков EGFR и Met.

Определение состава иммунных клеток в РВМС

РВМС (приобретенные у компании Hemacare) размораживали в среде X-VIVO-15 с 10% FBS и подсчитывали. После подсчета высевали от ~300 000 до 400 000 клеток/лунка (в трех повторностях) и центрифугировали планшет при температуре 4 °С и 1500 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удаляли, а клетки промывали 150 мкл/лунка буфера DPBS. Планшет повторно центрифугировали для осаждения, как описано выше. Исходный раствор красителя для дифференциации живых/мертвых клеток в ближнем ИК диапазоне (Life Technologies, кат. № L10119) готовили путем добавления 150 мкл DMSO к содержимому для окрашивания. Затем готовили рабочий раствор, добавляя 50 мкл исходного раствора к 10 мл буфера DPBS. Затем в каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл рабочего раствора и ресуспендировали. Планшет инкубировали в темноте (покрытым фольгой) при комнатной температуре в течение 30 мин. В конце инкубации планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 4 °С и 1500 об/мин. Затем клетки промывали буфером для FACS/красителем (BD# 554657) путем добавления 150 мкл на лунку. Антитела для панели многоцветной проточной цитометрии готовили в виде смеси согласно расчетам и добавляли 25 мкл/лунку. Антитела, используемые в панели, включали CD19 (FITC), CD56 (BV711), Cd11b (BUV395), CD14 (PE-cy7), CD3 (BV605), CD4 (BV785), CD8 (PerCP-cy5.5), CD25 (PE) и PD-1 (APC). Планшет инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Компенсирующий планшет готовили с использованием компенсирующих гранул и одноканальных антител из вышеуказанной панели в соответствии с расчетами и инкубировали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Все планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в

течение 5 мин и температуре 4 °С и дважды промывали 150 мкл буфера FACS. Планшет для анализа ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS, а компенсационный планшет - в 200 мкл буфера FACS. Пластины анализировали на приборе Fortessa, где компенсация была установлена с использованием одноканальных контрольных значений пластины компенсирующих гранул. Затем планшет для анализа запускали со скоростью потока 1,5 мкл/сек с применением компенсации. Затем данные экспортировали и анализировали в FLOWJo, где это было необходимо, выполняли гейтирование для получения процентной доли каждой из отдельных популяций иммунных клеток в PBMC.

Анализ пролиферации и апоптоза

Клетки HSI-H1975 (также называемые в настоящем документе клетками H1975) получили от Американской коллекции типовых культур (ATCC) и культивировали в RPMI (Invitrogen, № по кат. 72400-047) с добавлением 10% HI FBS, 1X NEAA, 1X пирувата натрия. Для анализа пролиферации и апоптоза с использованием Incucyte клетки H1975 инфицировали лентивирусным реагентом Incucyte NucLight Red (№ по кат. 4476, Essen Biosciences) и отбирали с помощью 1 мкг/мл пурамицина с получением клеток H1975 NucRed. Эти клетки помещали в среду, не содержащую RPMI-фенолового красного, с добавлением 10% HI FBS, 1X NEAA, 1X пирувата натрия для эксперимента.

Клетки H1975-NucRed диссоциировали с использованием буфера Invitrogen Cell Dissociation Buffer (поскольку трипсин разрушает рецепторы/молекулы клеточной поверхности) и подсчитывали. Клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин и удаляли супернатант. Затем осадки ресуспендировали в соответствующем объеме среды, не содержащей фенолового красного. Клетки NucRed (клетки-мишени) высевали по 12 500 клеток/лунка в 100 мкл среды с феноловым красным в обработанные тканевой культурой черные плоскодонные планшеты и инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день PBMC (приобретенные у компании NemaCare) размораживали в среде X-VIVO-10 с 10% FBS и подсчитывали. PBMC разбавляли до концентрации 125 000 клеток на лунку в 50 мкл с получением соотношения эффектор : мишень (E : T) 10 : 1. Реагент Incucyte Annexin V Green (№ по кат. 4642, Essen Biosciences) ресуспендировали в 100 мкл среды и использовали для окрашивания 100 лунок или одного 96-луночного планшета. Разбавленный аннексиновый реагент добавляли к PBMC или средам. 50 мкл PBMC/среды (с аннексином) добавляли в соответствующие лунки аналитического планшета. Затем терапевтические антитела последовательно разводили до 1 : 5 и готовили в 4-кратной концентрации в соответствии с расчетами. В соответствующие лунки планшета для анализа добавляли 50 мкл необходимого антитела. Затем планшеты для анализа помещали в соответствующие гнезда в Incucyte S3 и уравнивали в Incucyte в течение 20 мин перед сканированием. Планшеты сканировали каждые 4 часа с 4 изображениями на лунку/сканирование до 120 часов для определения пролиферации клеток-мишеней и апоптоза с течением времени. Флуоресценцию клеток-мишеней (NucRed) и флуоресценцию аннексина (Green) определяли количественно с использованием определения процесса и рассчитывали общую площадь NucRed H1975

($\mu\text{мкм}^2/\text{лунку}$), которая показывает пролиферацию клеток-мишеней. Также была рассчитана общая площадь Green NucRed H1975 ($\text{мкм}^2/\text{лунка}$), которая показывает апоптоз клеток-мишеней. На основании этого анализа для расчета площади под кривой (AUC) использовали программный пакет Graphpad Prism и строили нелинейные кривые доза-ответ.

Simple Western для определения уровней белков EGFR, c-Met, pEGFR и pMet

Клетки H1975 и SNU-5 получили из ATCC и культивировали в RPMI (Invitrogen, № по кат. 72400-047) с добавлением 10% Hi FBS, 1X NEAA, 1X пирувата натрия. Клетки H1975 диссоциировали с помощью буфера для диссоциации клеток Cell Dissociation Buffer, каждую клеточную суспензию помещали в коническую пробирку объемом 50 мл и подсчитывали. При анализах с использованием SNU-5 (суспендированная клеточная линия) клеточную суспензию переносили в коническую пробирку объемом 50 мл и подсчитывали. Клетки осаждали центрифугированием при 1300 об/мин в течение 5 мин при температуре 4 °C и ресуспендировали в соответствующем объеме среды RPMI. Клетки-мишени высевали в концентрации 100 000 клеток на лунку в 6-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. На следующий день PBMC (приобретенные у компании NemeCare) размораживали в среде X-VIVO-15 с 10% FBS и подсчитывали. PBMC разбавляли и высевали в концентрации 1 000 000 клеток на лунку с соотношением E : T, которое составляло 10 : 1. При использовании отдельных иммунных клеток, таких как НК-клетки, моноциты или макрофаги, их разбавляли и высевали в концентрации 500 000 клеток на лунку с соотношением E : T, которое составляло 5 : 1. Терапевтические антитела затем готовили в 2-кратной концентрации в соответствии с расчетами. В соответствующие лунки аналитического планшета добавляли 1,5 мл необходимого антитела. Планшеты инкубировали в течение 48 ч (для большинства анализов) или в течение различного времени.

В конце периода инкубации в каждую лунку добавляли 100 мкл свежеприготовленного лизирующего буфера и инкубировали на льду в течение 5 мин. Лизирующий буфер получали с использованием 10 мл буфера RIPA (ThermoFisher; кат. № 89901) с 1 таблеткой ингибитора фосфатазы PhosSTOP (Sigma; кат. № 4906837001) и 1 таблеткой ингибитора протеаз cOmplete™, Mini, а также смеси ингибиторов протеаз, не содержащей ЭДТА (Sigma; кат. № 04693159001). С помощью скребка для планшетов лизаты переносили в пробирку "Эппендорф" объемом 2 мл и инкубировали на льду в течение 30 мин при периодическом встряхивании. Лизаты центрифугировали при 13 200 об/мин в течение 25 мин при температуре 4 °C. Супернатанты переносили в новые пробирки. Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью набора для анализа белка Pierce BCA (кат. № 23227, ThermoFisher) в соответствии с протоколом производителя. Для построения стандартной кривой для анализа использовали эталонные предварительно разбавленные стандарты бычьего сывороточного альбумина Pierce (№ по кат. 23208, поставляемый компанией ThermoFisher). Вкратце, 25 мкл предварительно разведенных стандартов добавляли в трех повторностях, а 25 мкл образцов (разведенных 1

: 5) добавляли в двух повторностях в 96-луночный плоскодонный планшет. В каждую лунку добавляли 200 мкл полученного рабочего реагента ВСА. Планшет осторожно перемешивали в течение 1 мин на планшетном шейкере и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, закрывая фольгой. После инкубации планшету давали остыть при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего проводили количественную оценку белка с помощью спектрофотометра SpectraMAX при 562 нм.

Для проведения капиллярного электрофореза с использованием PeggySue отдельно использовали модуль разделения Peggy Sue Separation 12-230 кДа (кат. № SM-S001, приобретенный у компании Protein Simple) с модулем обнаружения анти-кроличьих антител (кат. № DM-001) и вторичных анти-мышинных антител (кат. № 042-205), оба приобретены у компании Protein Simple. Готовили образцы, антитела и реагенты, а также проводили капиллярный электрофорез в соответствии с протоколом производителя. Компоненты 2 стандартных упаковок были использованы для приготовления биотинилированного лэддера и 5-кратного мастер-микса. Белковые лизаты разводили до концентрации 0,25 мг/мл с использованием 0,1X буфера для проб в соответствии с расчетами с использованием значений из анализа белка ВСА. 4 части полученного лизата объединяли с 1 частью 5-кратного флуоресцентного мастер-микса с получением конечной концентрации 0,2 мг/мл. Образцы и биотинилированный лэддер денатурировали с помощью термоциклера для ПЦР при 95 °С в течение 5 мин. Первичные антитела, используемые для анализа, разбавляли следующим образом с использованием разбавителя: EGFR (№ по кат. 2646 от Cell Signaling Technologies), 1 : 50; pEGFR (№ по каталогу AF1095 от R&D Systems), 1 : 50; c-Met (№ по кат. 3148 от Cell Signaling Technologies), 1 : 50; pMet (кат. № 3077, Cell Signaling Technologies), 1 : 50, актин для контроля нанесения (кат. № 4970, производитель Cell Signaling Technologies) в 1 : 200 или (кат. № 4947, производитель Cell Signaling Technologies) в 1:100. Лэддер, образцы, первичные и вторичные антитела, матрицы разделения и укладки добавляли в планшет Peggy Sue на 384 лунок в соответствии со схемой планшета. Планшет центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего его помещали в прибор. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Compass for SW. Пики определяли на основании молекулярной массы интересующих белков и рассчитывали площадь под кривой (AUC) для каждого белка в каждом из образцов. Затем значения денситометрии для интересующего белка нормализовали к актину для контроля нанесения каждого образца. После чего нормализовали к контролю без обработки для получения относительных изменений при обработке.

Анализ тромбоцитоза с использованием конфокальной визуализации

Дифференцированные макрофаги собирали и высевали на планшеты CellCarrier96 ultra в количестве 1 000 000 клеток/лунка (Perkin-Elmer; кат. № 6055302) на ночь. Анализы проводили с использованием как прикрепленных, так и неприкрепленных клеток-мишеней. Для анализов с прикрепленными клетками-мишенями клетки H1975 NucLight Red высевали в количестве 20 000/лунка, закрепляли в течение 4 часов и затем

обрабатывали смесью меченых антител в течение 1 часа при 4 °С. В анализах с неприкрепленными клетками-мишенями только клетки-мишени окрашивались AF647-меченым JNJ-372 или контрольными антителами. Все исследования с визуализацией в реальном времени проводили при соотношении E : T, которое составляло 5 : 1. С смесь антител для мечения состояла из анти-CD11b (BD Pharmingen; кат. № 557701), анти-CD14 (BD Pharmingen; кат. № 562689) и 1 : 8000 Hoechst33342 (Biotium; кат. № 40046). Изображения получали с интервалами 11 минут на приборе Perkin-Elmer Phenix Opera с использованием 60-кратного объектива с водной иммерсией и анализировали с использованием Columbus.

Анализ ADCC

PBMC размораживали за один день до анализа в среде X-VIVO 10 (Lonza, кат. № 04-380Q) с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS (GIBCO, кат. № 16140) и культивировали в течение ночи в стандартных условиях инкубации (37 °С, 5% CO₂, влажность 95%). В день анализа клетки-мишени NCI-H1975 загружали реагентом DELFIA BATDA (PerkinElmer Inc., № по кат. C136-100) в течение 30 минут, промывали 3 раза и ресуспендировали в среде RPMI. PBMC и загруженные BATDA клетки-мишени добавляли в 96-луночные планшеты с U-образным дном при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 25 : 1 вместе с возрастающими концентрациями исследуемых антител. Для измерения спонтанного и максимального высвобождения TDA в контрольные лунки добавили среду RPMI или RPMI, содержащую 2% Triton X-100 (EMD Millipore, № по кат. 648463) соответственно. Планшеты инкубировали в течение 2 часов, после чего отбирали 20 мкл супернатанта и объединяли с 200 мкл раствора DELPHIA, содержащего европий (Perkin Elmer, № по кат. C135-100). После инкубации при КТ в течение 15 мин измеряли относительные единицы флуоресценции (ОЕФ) с использованием планшетного спектрофотометра EnVision 2104 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, № по кат. 2104-0010). Процент лизиса рассчитывали как (экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение) X 100.

Дифференцировка моноцитов в макрофаги M1, M2a и M2c

Моноциты (Nemasage) размораживали в среде XVIVO-15 и дифференцировали с использованием 50 нг/мл M-CSF (R&D systems; кат. № 216-MC-025/CF) в течение 6 дней для получения макрофагов M0. Для получения макрофагов M1 на 5 день макрофаги M0 поляризовали 50 нг/мл M-KCФ и 100 нг/мл IFN-γ (R&D systems; кат. № 285-IF-100/CF) в течение 48 часов. Для получения макрофагов M2 на 5 день макрофаги M0 поляризовали 20 нг/мл IL-4 (R&D systems; кат. № 204-IL-020/CF) и IL-13 (R&D systems; кат. № 213-ILB-025/CF) для M2a или 20 нг/мл IL-10 (R&D systems; кат. № 217-IL-025/CF) для макрофагов M2c в течение 48 часов.

Исследования в условиях in vivo

Клеточную линию H1975 подкожно имплантировали самкам бестимусных мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель (CAnN.Cg-Foxn1tm/CrJ, Charles River Laboratories, г.

Уилмингтон, штат Массачусетс, США). Когда опухоли достигали в среднем $72 \pm 8,7 \text{ мм}^3$, внутрибрюшинно вводили антитело к mCSF-1 R (400 мкг/мышь) три раза в неделю в течение всего исследования, начиная с пяти дней перед началом введения соединения, чтобы способствовать снижению количества макрофагов. В день 5 (средний объем опухоли составлял $102 \pm 36,6 \text{ мм}^3$) им дважды в неделю вводили внутрибрюшинно антитело изотипического контроля 10 мг/кг, JNJ-372 или антитело к EGFR/c-Met IgG2 σ . После введения двух доз соединения образцы опухоли отбирали для отслеживания инфильтрации макрофагов. Для исследования опухолевой модели SNU5 клетки SNU5 подкожно имплантировали самкам мышей CB17/SCID в возрасте 7-8 недель (HFK Bio-Technology Co. Ltd., Пекин, Китай). Когда опухоли достигали в среднем $155 \pm 21,4 \text{ мм}^3$, мышам дважды в неделю вводили внутрибрюшинно фосфатно-буферный раствор (PBS), JNJ-372 (5 мг/кг) или антитело EGFR-c-Met IgG2 σ (5 мг/кг) в течение трех недель. В обоих исследованиях размер опухолей и массу тела регистрировали два раза в неделю. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали в последний день, когда в исследовании оставалось > 80% контрольных мышей, по формуле $[1-(T/C)]*100$. Все эксперименты *in vivo* проводились в соответствии с положениями Институционального комитета по уходу за животными и их использованию - Johnson and Johnson Institutional Animal Committee and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Определение макрофагов, связанных с опухолью, на основании проточной цитометрии

Опухоли вырезали у мышей, взвешивали, нарезали на фрагменты размером 2-4 мм, помещали в С-пробирки (Miltenyi, № по кат. 130-093-237), содержащие 2,5 мл RPMI, и хранили на льду. В соответствии с инструкциями производителя лиофилизированные ферменты, содержащиеся в наборе для диссоциации опухолей человека (Miltenyi, № по каталогу 130-095-929), разводили, готовили 2-кратный ферментный коктейль, опухоли диссоциировали на GentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi, № по кат. 130-095-937) с использованием производственного протокола «h_tumor_01» с последующими двумя циклами инкубации при 37 °C в течение 30 минут. Диссоциированные клетки дважды промывали в буфере FACS Stain Buffer (BD Pharmingen, № по кат. 554657) и пропускали через клеточный фильтр Falcon с размером пор 40 мкм (Corning, № по кат. 352340). Клетки инкубировали в растворе GolgiPlug (BD, кат. № 555029), разведенном 1 : 1000 буфером FACS, и инкубировали в течение 3 часов при 37 °C, дважды промывали и ресуспендировали в 100 мкл смеси антител для окрашивания. Смесь антител состояла из анти-CD45 (кат. № 103138), анти-F4/80 (кат. № 123137), анти-Ly6G (кат. № 127639), анти-MHCP (кат. № 107612), анти-EpCAM (кат. № 324214), анти-PD1 (кат. № 135231), анти-PD-L1 (кат. № 393606), анти-CD206 (кат. № 141729) от BioLegend, анти-CD11b (кат. № 563553) и анти-Ly6C (кат. № 561237) от Becton-Dickinson, анти-iNOS (кат. № 25-5920-82) и красителя для дифференциации живых и мертвых клеток Fixable Live/Dead (кат. № L10119) от Invitrogen. Клетки инкубировали с антителами к маркерам клеточной поверхности в течение 30 минут при 4 °C, защищая от света, дважды промывали PBS и

ресуспендировали в PBS, содержащем фиксируемый краситель Live/Dead, инкубировали в течение 30 минут при 4 °C и дважды промывали буфером FACS (BD Pharmingen; кат. № 554657). Клетки фиксировали/пермеабелизировали в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen, № по кат. 88-8824-00), инкубировали с антителами к внутренней мишени в течение 30 минут при 4 °C, дважды промывали буфером FACS и ресуспендировали в 200 мкл для анализа на BD LSR Fortessa. Для компенсации использовали гранулы UltraComp (для антител; Invitrogen, № по кат. 01-2222-42) и реакционных гранул ArC Amine (для Fixable Live/Dead, Invitrogen, № по кат. A10346). Контроли FMO использовали для всех маркеров. Для определения связанного с опухолью обеднения макрофагов их определяли как CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ F4/80⁺.

Мультиплексный анализ и статистический анализ MSD

Для экспериментов с использованием PBMC, NK-клеток и моноцитов клетки NCI-H1975 высевали на 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. На следующий день добавляли PBMC, моноциты или NK-клетки в соотношении 10 : 1, 5 : 1 и 5 : 1 соответственно. Для экспериментов с макрофагами моноциты дифференцировали как описано ранее, диссоциировали с использованием фермента аккутазы StemPro (Gibco, № по кат. A11105-01), высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. На следующий день клетки NCI-H1975 добавляли в соотношении E : T, которое составляло 5 : 1. Клетки обрабатывали изотипическим контролем, JNJ-61186372 или IgG2Sigma в различных концентрациях и инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 ч, 24 ч, 48 ч и/или 72 ч. В обозначенное время планшеты центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли и оценивали с помощью U-plex и V-plex форматов MesoScale Discovery (MSD) для соответствующих анализов на цитокины в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, при использовании планшетов U-plex за день до анализа планшеты покрывали антителом и линкерами в соответствии с протоколом производителя и инкубировали на орбитальном шейкере при 4 °C в течение ночи. В день эксперимента планшеты U-plex и V-plex 3 раза промывали промывочным буфером MSD, добавляли в планшеты супернатанты, стандарты и калибраторы и анализировали в соответствии с протоколом производителя. Планшеты считывали на приборе MSD Sector и анализировали с использованием прибора GTS Spotfire для получения расчетных уровней (в пг/мл) для каждого цитокина при помощи стандартной кривой.

Чтобы сравнить выраженность ответа, на основании рассчитанных концентраций рассчитывали площадь под кривой (AUC) по трапециевидному способу для каждой терапии, типа клеток и времени инкубации. Данные ответа исключали, если наблюдаемое значение было меньше нижнего предела обнаружения, а AUC рассчитывали только в при наличии по меньшей мере 6 достоверных наблюдений из 8 концентраций доз. Затем получали тепловую карту для иллюстрации доступности данных (данные отсутствуют, недостаточно данных или расчетных данных AUC) для всех цитокинов и условий. Затем получали тепловые карты логарифмически преобразованной AUC по времени инкубации,

ограниченные цитокинами с по меньшей мере одной измеримой AUC в типе клеток H1975+PBMC. Все тепловые карты были созданы с использованием пакета heatmap.2 в статистической программе R версии 3.5.0 (R Core Team 2018; R: Язык и среда для статистических вычислений; <http://www.R-project.org/>). В конце, для каждого условия рассчитывали относительное изменение JNJ-372 и IgG2 σ по сравнению с изотипом и строили гистограммы или кривые дозы с помощью Graphpad Prism.

Пример 1. Антипролиферативное и апоптозное действие JNJ-372 на опухолевые клетки обусловлено взаимодействием Fc с иммунными клетками

Чтобы оценить влияние Fc-взаимодействия на три противоопухолевых механизма JNJ-372, JNJ-372 конструировали в виде эффекторной молекулы с молчащим Fc-фрагментом путем замены IgG1 дикого типа на IgG2 σ с молчащим эффектором (IgG2 σ , содержащий мутации V234A G237A P238S H268A V309L A330S P331S по сравнению с IgG2 дикого типа) (JNJ-372.IgG2 σ), используя стандартные способы клонирования. Инженерное антитело с молчащей эффекторной функцией называют JNJ-372.IgG2 σ (или на некоторых Фиг. IgG2). JNJ-372 продуцируется в клеточных линиях с низкими уровнями (< 9%) фукозы для улучшения связывания с Fc γ RIII/ CD16 и ADCC. Следовательно, в качестве другого контроля JNJ-372 также экспрессировали в клетке CHO с нормальным уровнем фукозы; эта молекула обозначается как JNJ-372.NF (NF: нормальная фукоза). Уничтожение опухолевых клеток оценивали с использованием клеток NCI-H1975 (ATCC, № по кат. CRL-5908); линия клеток экспрессирует мутантный EGFR L858R/T790M и c-Met дикого типа.

Клетки, экспрессирующие NCI-H1975 NucLight Red, обрабатывали изотипическим контролем, JNJ-372, JNJ-372.IgG2 σ или JNJ-372.NF и культивировали в присутствии или в отсутствие PBMC с соотношением эффектор : мишень 10 : 1. Пролиферацию клеток NCI-H1975 оценивали в течение 5 суток после начала совместного культивирования. Присутствие PBMC повышало способность JNJ-372 ингибировать пролиферацию опухолевых клеток с течением времени дозозависимым образом (ФИГ. 1), тогда как JNJ-372 не ингибировал пролиферацию в отсутствие PBMC в исследуемых концентрациях (ФИГ. 2).

Чтобы подтвердить, что взаимодействие Fc с PBMC ответственно за этот эффект, клетки, экспрессирующие H1975 NucLight Red, обрабатывали JNJ-372, JNJ-372.IgG2 σ и JNJ-372.NF и культивировали в присутствии или в отсутствие PBMC при соотношении E : T 10 : 1 в течение 4, 24, 48, 72 или 96 часов, после чего оценивали пролиферацию и апоптоз клеток H1975. Присутствие PBMC усиливало дозозависимые антипролиферативные эффекты и дозозависимый апоптоз (определяемый по аннексин-положительности), индуцированный JNJ-372 через 24, 48, 72 и 96 часов. При использовании изотипа или JNJ-372.IgG2 σ эффекты были минимальные или отсутствовали. На ФИГ. 3 показана зависимость эффекта от дозы изотипического контроля, JNJ-372, JNJ-372.IgG2 σ или JNJ-372.NF при оценке ингибирования пролиферации клеток H1975 после 72 часов культивирования в присутствии или в

отсутствие РВМС. На **ФИГ. 4** показана зависимость эффекта от дозы изотипического контроля, JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или JNJ-372.NF при оценке апоптоза после 48 часов культивирования в присутствии или в отсутствие РВМС. JNJ-372.NF оказывает частичное влияние на пролиферацию (**ФИГ. 3**) и апоптоз (**ФИГ. 4**) по сравнению с JNJ-372, что указывает на то, что FcγRIII играет определенную роль, но не полностью ответственен за эффекты, опосредованные взаимодействием Fc.

В анализах использовали РВМС от семи разных доноров с соотношением эффектор : мишень, которое составляло 10 : 1. Значения IC₅₀ и % макс. уничтожения в анализе пролиферации NCI-H1975 показаны в **таблице 1** для шести доноров. РВМС от одного донора не оказывали влияния. Вариабельность IC₅₀ и % максимального уничтожения наблюдали со всеми РВМС, полученным от разных доноров.

Таблица 1.

№ донора	72 часа		48 часов	
	IC ₅₀ (нг/мл)	% макс. уничтожения	IC ₅₀ (нг/мл)	% макс. уничтожения
1	1,2	43,7	2,99	31,8
2	0,776	53,7	1,57	36,6
3	4,87	72,3	6,93	52,6
4	4,44	57,8	4,36	40,5
5	0,59	70,5	0,79	43,9
7	0,567	34,7	0,76	28,3

Пример 2. JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии белка EGFR и с-Met и нисходящей передачи сигналов в линиях мутантных опухолевых клеток EGFR опосредуется взаимодействиями Fc с иммунными клетками

Присутствие иммунных клеток (РВМС) усиливает JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии белков EGFR и с-Met и ингибирование их фосфорилирования.

Клетки NCI-H1975 обрабатывали изотипом 10 мкг/мл или JNJ-372, культивировали в присутствии или в отсутствие РВМС от одного донора при соотношении E : T, которое составляло 10 : 1, в течение 4, 24, 48 или 72 часов, и измеряли количество EGFR, с-Met и pEGFR (pY1173). Актин использовали в качестве контроля нанесения. Присутствие РВМС усиливало опосредованное JNJ-372 снижение экспрессии EGFR, с-Met и pEGFR (pY1173) во все контрольные моменты времени. На **ФИГ. 5** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), показывающее белки EGFR и с-Met и pEGFR в образцах, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372 и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на **Фиг.** На **ФИГ. 6** показано относительное количество EGFR в каждом образце. На **ФИГ. 7** показано относительное количество pEGFR pY1173 в каждом образце. На **ФИГ. 8** показано относительное количество с-Met в каждом образце. Образцы

нормализовали к количеству актина, использовавшегося в качестве контроля нанесения, в каждом образце, а затем к контрольному образцу (без обработки).

РВМС от семи доноров тестировали на способность усиливать JNJ-372-опосредованное ингибирование уровней белков EGFR, c-Met и pEGFR. Среди доноров наблюдалась вариабельность РВМС. РВМС доноров 1, 3, 4 и 6 были наиболее эффективны в усилении JNJ-372-опосредованных эффектов. На **ФИГ. 9** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), показывающее белки EGFR и c-Met и pEGFR в образцах, обработанных изотипическим контролем или JNJ-372, культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС от семи разных доноров, как показано на Фиг. На **ФИГ. 10** показано относительное количество EGFR в каждом образце. На **ФИГ. 11** показано относительное количество pEGFR pY1173 в каждом образце. На **ФИГ. 12** показано относительное количество c-Met в каждом образце. Образцы нормализовали к количеству актина, использовавшегося в качестве контроля нанесения, в каждом образце, а затем к контрольному образцу (без обработки).

Пример 3. Присутствие моноцитов или макрофагов является достаточным и необходимым для опосредованного Fc усиления ингибирующего эффекта JNJ-372 на передачу сигнала EGFR и c-Met

Состав иммунных клеток в РВМС от семи разных доноров, использованных в примере 2, оценивали с использованием многоцветной проточной цитометрии, чтобы понять различия в способности различных образцов РВМС усиливать способность JNJ-372 подавлять передачу сигналов EGFR и c-Met. Вариабельность между донорами определяли в процентах от отдельных иммунных клеток (данные не показаны). Определяли корреляцию между процентной долей отдельных иммунных клеток у каждого из 7 доноров и способностью РВМС каждого донора опосредовать снижение экспрессии EGFR/pEGFR/Met. Между NK-клетками, В-клетками или Т-клетками и способностью РВМС усиливать снижение модуляции EGFR, pEGFR или c-Met (данные не показаны) корреляция не наблюдалась. Однако была выявлена положительная корреляция между % моноцитов в РВМС и способностью РВМС усиливать снижение уровней белка EGFR (**ФИГ. 13**), между % моноцитов в РВМС и способностью РВМС усиливать снижение pEGFR (**ФИГ. 14**) и между % моноцитов в РВМС и способностью РВМС усиливать снижение уровней белка c-Met (**ФИГ. 15**). Это указывает на то, что для опосредованного JNJ-372 подавления сигнала требуется более высокое процентное содержание моноцитов в РВМС.

Количество NK-клеток или моноцитов в РВМС от одного донора было уменьшено и оценено влияние NK-клеток или моноцитов РВМС на JNJ-372-опосредованное подавление путей EGFR и c-Met. Клетки H1975 обрабатывали изотипическим контролем 10 мкг/мл или JNJ-372 и культивировали в присутствии или в отсутствие обедненных NK-клетками или моноцитами РВМС, полученных от одного донора, при соотношении Е : Т, которое составляло 10 : 1, в течение 48 часов. В соответствии с предыдущими результатами присутствие РВМС усиливало опосредованное JNJ-372 снижение

экспрессии EGFR, pEGFR и c-Met в клеточной линии H1975. Хотя уменьшение количества NK-клеток имело лишь минимальный эффект, уменьшение количества моноцитов PBMC существенно обращало способность PBMC усиливать JNJ-372-опосредованное подавление сигнала. На **ФИГ. 16** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие PBMC, обедненных NK-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 17** показано относительное количество EGFR в NCI-H1975, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие PBMC, обедненных NK-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 18** показано относительное количество pEGFR (pY1173) в NCI-H1975, обработанном JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие PBMC, обедненных NK-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 19** показано относительное количество c-Met в NCI-H1975, обработанном JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие PBMC, обедненных NK-клетками или моноцитами (моно), от одного донора, как показано на Фиг. Образцы нормализовали к количеству актина, использовавшегося в качестве контроля нанесения, в каждом образце, а затем к контрольному образцу (без обработки).

Для дополнительной оценки роли миелоидного компартмента оценивали влияние моноцитов или макрофагов M1 от одного донора PBMC на индуцированное взаимодействием Fc JNJ-372 снижение экспрессии EGFR/c-Met. Макрофаги M1 были получены путем дифференциации моноцитов двумя способами, с M-CSF и GM-CSF для оценки любых потенциальных дифференциальных эффектов. Клетки H1975 обрабатывали изотипом 10 мкг/мл, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma и культивировали в присутствии или в отсутствие PBMC от одного донора с соотношением E : T, составляющим 10 : 1 (для PBMC) или 5 : 1 (для отдельных иммунных клеток (моноцитов, NK-клеток, MCSF M1 или GMCSF M1)), в течение 48 часов. Присутствие PBMC повышало опосредованное JNJ-372 снижение экспрессии белков EGFR, pEGFR и c-Met. Хотя NK-клетки не оказывали существенного эффекта, выделенные моноциты или макрофаги M1 (дифференцированные M-CSF или GM-CSF) от того же донора PBMC значительно повышали способность к JNJ-372-опосредованному подавлению сигнала. Это указывает на то, что миелоидная линия является достаточной для взаимодействия с Fc и опосредованного PBMC усиления снижения экспрессии сигнала JNJ-372. На **ФИГ. 20** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие PBMC, выделенных моноцитов, NK-клеток, MCSF-дифференцированных или GMCSF-

дифференцированных макрофагов M1 от того же донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 21** показано относительное количество EGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, НК-клеток, моноцитов, макрофагов M1 MCSF или макрофагов M1 GMCSF от того же донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 22** показано относительное количество pEGFR (pY1173) в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, НК-клеток, моноцитов, макрофагов M1 MCSF или макрофагов M1 GMCSF от того же донора, как показано на Фиг. На **ФИГ. 23** показано относительное количество c-Met в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие РВМС, НК-клеток, моноцитов, макрофагов M1 MCSF или макрофагов M1 GMCSF от того же донора, как показано на Фиг. Образцы нормализовали к количеству актина, использовавшегося в качестве контроля нанесения, в каждом образце, а затем к контрольному образцу (без обработки).

Впоследствии оценивали влияние различных подтипов макрофагов на снижение EGFR/c-Met, вызванное взаимодействием JNJ-372 Fc. Моноциты, полученные от одного донора, дифференцировали в макрофаги M1, M2a и M2c и оценивали их способность усиливать JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии EGFR/c-Met. Клетки H1975 обрабатывали 10 мкг/мл изотипа, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma и культивировали в присутствии или в отсутствие макрофагов M1, M2a или M2c, полученных путем дифференцировки моноцитов от одного донора, при соотношении E : T, которое составляло 5 : 1, в течение 48 часов. Присутствие всех M1, M2a и M2c существенно усиливало JNJ-372-опосредованное снижение экспрессии белков EGFR, pEGFR и c-Met. На **ФИГ. 24** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем и культивированных в присутствии макрофагов M1 (M1) или макрофагов M2a (M2a), как показано на Фиг. На **ФИГ. 25** представлено изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни EGFR, c-Met и pEGFR в клетках NCI-H1975, обработанных JNJ-372, JNJ-372.IgG2sigma или изотипическим контролем и культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие макрофагов M2c (M2c), как показано на Фиг.

Пример 4. JNJ-372-опосредованное снижение белков EGFR и c-Met и их нисходящей передачи сигналов опосредуется взаимодействиями Fc в линиях опухолевых клеток с амплификацией c-Met

Клетки SNU-5 (клеточная линия с амплификацией c-Met) обрабатывали 10 мкг/мл JNJ-372 или изотипическим контролем и культивировали в присутствии или в отсутствие РВМС от одного донора при соотношении E : T, которое составляло 10 : 1, в течение 48 часов. Добавление РВМС усиливало способность JNJ-372 уменьшать экспрессию EGFR,

pEGFR, c-Met и p-Met. На **ФИГ. 26** показано изображение капиллярного электрофореза (Simple Western с использованием PeggySue), определяющего уровни белка EGFR, c-Met и pEGFR в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг. На **ФИГ. 27** показано относительное количество EGFR в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг. На **ФИГ. 28** показано относительное количество pEGFR (pY1173) в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг. На **ФИГ. 29** показано относительное количество c-Met в образцах клеточной культуры SNU-5, культивированных в течение 48 часов в присутствии или в отсутствие JNJ-372, изотипического контроля или РВМС, как показано на Фиг. На **ФИГ. 30** показано относительное количество pMet (pY1234/1235) в клетках SNU-5, обработанных JNJ-372 или изотипическим контролем и культивированных в присутствии или в отсутствие РВМС, как показано на Фиг. Образцы нормализовали к количеству актина, использовавшегося в качестве контроля нанесения, в каждом образце, а затем к контрольному образцу (без обработки).

Пример 5. Взаимодействие Fc JNJ-372 с FcγR-опосредованным ингибированием роста опухоли in vivo

Затем оценивали роль и значимость взаимодействий Fc/FcγR in vivo с использованием моделей с ксенотрансплатами клеточной линии H1975 и SNU5.

Клеточную линию NCI-H1975 подкожно имплантировали самкам бестимусных мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель (CAnN.Cg-Foxn1tm/Cr1, Charles River Laboratories, г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США). Когда опухоли достигали в среднем $72 \pm 8,7 \text{ мм}^3$, внутрибрюшинно вводили антитело к mCSF-1R (400 мкг/мышь) три раза в неделю в течение всего исследования, начиная с пяти дней перед началом введения соединения, чтобы способствовать снижению количества макрофагов. В день 5, когда размер опухоли составлял в среднем $102 \pm 36,6 \text{ мм}^3$, им дважды в неделю вводили внутрибрюшинно антитело изотипического контроля (10 мг/кг), JNJ-372 (10 мг/кг) или JNJ-372.IgG2sigma (10 мг/кг). В когорте мышей отбирали опухоли для контроля инфильтрации макрофагов после введения двух доз соединения. Клеточную линию SNU5 подкожно имплантировали самкам мышей CB17/SCID в возрасте 7-8 недель (HFK Bio-Technology Co. Ltd., Пекин, Китай). Когда объем опухолей в среднем составлял $155 \pm 21,4 \text{ мм}^3$, мышам дважды в неделю вводили внутрибрюшинно фосфатно-буферный раствор (PBS), JNJ-372 (5 мг/кг) или JNJ-372.IgG2sigma (5 мг/кг) в течение трех недель. В обоих исследованиях два раза в неделю на протяжении каждого исследования регистрировали размер опухоли и массу тела. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали в последний день, когда в исследовании оставалось $> 80\%$ контрольных мышей, по формуле $[1-(T/C)]*100$. Все эксперименты in vivo проводились в соответствии с положениями Институционального комитета по уходу за животными и их использованию - Johnson and

Johnson Institutional Animal Committee and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

В модели H1975 введение JNJ-372 привело к ингибированию роста опухоли (TGI) на 75% по сравнению с изотипическим контролем (ФИГ. 31). Однако JNJ-372.IgG2sigma был значительно менее эффективен, и TGI составило всего 30% (ФИГ. 31). Аналогичным образом, введение JNJ-372 было высокоэффективным в снижении роста опухоли в модели SNU5 с амплификацией MET с TGI 96%, тогда как введение JNJ-372.IgG2sigma было неэффективным (TGI -17%) (ФИГ. 32). Никакого влияния на массу тела мышей при введении антител ни в одной из этих опухолевых моделей (ФИГ. 32) не наблюдалось.

Пример 6. Fc-взаимодействие индуцировало ADCC, опосредованное NK-клетками, но не CDC

Исследована способность JNJ-372 индуцировать различные эффекторные функции Fc. JNJ-372-индуцированный ADCC измеряли с помощью анализа высвобождения европия в присутствии РВМС от семи различных доноров. Опосредованный антителами лизис клеток H1975 был разным у разных доноров, при этом у некоторых доноров наблюдалась активность ADCC ~60-70%, в то время как у других не было измеримой активности ADCC (данные не показаны). Для оценки вклада Fc/FcγR клетки H1975 обрабатывали изотипическим контролем, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma в присутствии РВМС от 2 доноров. Хотя JNJ-372 индуцировал дозозависимую ADCC, гибели клеток при применении изотипического контроля или при обработке JNJ-372.IgG2sigma не наблюдалось (данные не показаны). Для определения подтипа иммунных клеток в РВМС, ответственных за JNJ-372-индуцированный ADCC, оценивали лизис ADCC, вызванный в присутствии РВМС, по сравнению с выделенными NK-клетками или моноцитами от того же донора. Как РВМС, так и NK-клетки, но не выделенные моноциты, индуцировали зависимый от JNJ-372 лизис ADCC (ФИГ. 33), что указывает на то, что NK-клетки отвечают за индуцированную JNJ-372 активность ADCC. Для JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma в отношении клеточных линий H1975 и H292 НМРЛ не наблюдалось измеримой активности CDC (данные не показаны), что позволяет предположить, что JNJ-372 не индуцирует CDC против этих клеточных линий НМРЛ.

Пример 7. Влияние макрофагов на уничтожение опухолевых клеток, опосредованное JNJ-372, in vivo

Чтобы изучить роль макрофагов in vivo, у мышей с ксенотрансплантатами опухолей H1975 уменьшали количество ассоциированных с опухолью макрофагов при помощи антитела CSF1R и измеряли эффективность JNJ-372. Введение антитела к CSF1R позволило значительно снизить TAM по сравнению с отсутствием введения (**, $p < 0,002$), при этом количество макрофагов уменьшилось с 11-15% до ~2% (ФИГ. 34). Затем животным вводили изотипический контроль, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma в течение 3 недель, при этом ни в одной группе мышей не наблюдали потери массы тела (данные не показаны). Как показано выше, JNJ-372 продемонстрировал значительно более высокую противоопухолевую эффективность по сравнению с изотипическим контролем (***, $p < 0,0001$) или JNJ-372.IgG2sigma (**, $p=0,004$) в опухолях без обработки антителом CSF1R

(ФИГ. 35). Примечательно, что истощение связанных с опухолью макрофагов (обработанных антителом к CS1R) значительно снижало TGI с 72,8% до 38,5% (***, $p < 0,0001$) (ФИГ. 35), что указывает на то, что макрофаги играют ключевую роль в опосредовании противоопухолевой эффективности JNJ-372 в условиях *in vivo*.

Эти результаты показали, что макрофаги необходимы для противоопухолевой эффективности в условиях *in vivo*.

Пример 8. Взаимодействие Fc JNJ-372 с иммунными клетками индуцирует зависимое от антител высвобождение цитокинов и хемокинов (ADCR)

Известно, что взаимодействие Fc-области терапевтических антител с FcR на иммунных клетках индуцирует секрецию хемокинов и цитокинов (ADCR) (Kinder *с соавт.*, *mAb* 7:494-504, 2015). Для оценки хемокинов и цитокинов, секретируемых при обработке изотипическим контролем, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma, в присутствии или отсутствии РВМС в течение 4 или 72 часов использовали панель цитокинов 71-plex MSD. Отчетливые различия наблюдались для нескольких секретируемых цитокинов в зависимости от препарата и времени; 32 из 71 цитокинов и 42 из 71 протестированных цитокинов имели надежный измеряемый ответ (AUC) через 4 и 72 часа соответственно. Дополнительный анализ, направленный на цитокины с > 1,5-кратной разницей между препаратами, показал, что через 4 ч (ФИГ. 36) и 72 ч (ФИГ. 37) после обработки у тринадцати и семи цитокинов соответственно наблюдалось повышение экспрессии при введении JNJ-372 по сравнению с изотипическим контролем или JNJ-372.IgG2sigma при совместном культивировании Н1975+РВМС. Многие измененные цитокины принадлежат к семейству хемотаксических цитокинов (хемокины ХЦ) (Фиг. 6В - MIP1 β , MCP-1, MCP-3, эотаксин, эотаксин-2), которые, как известно, функционируют как хемоаттрактанты для иммунных клеток врожденного иммунитета, моноцитов и макрофагов (Graves *с соавт.*, *Crit Rev Oral Biol Med* 6:109-18, 1995; Ugucioni *с соавт.*, *Eur J Immunol* 25:64-8, 1995; Balkwill, *Nat Rev Cancer* 4: 540-50, 2004).

Для дополнительной оценки этих цитокинов и изучения роли отдельных иммунных клеток в их секреции выбрали 23 цитокина (на основании их функции или изменения под действием JNJ-12) и оценивали при обработке изотипом антител JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma в присутствии РВМС по сравнению с отдельными иммунными клетками, выделенными от того же донора. Анализ тепловой карты выявил отчетливые изменения в паттернах экспрессии цитокинов с отдельными иммунными клетками, при этом хемокины ХЦ являются наиболее часто активируемым семейством при введении JNJ-372 из всех иммунных клеток. Более сфокусированный анализ цитокинов с > 1,5-кратной разницей в присутствии РВМС выявил паттерн повышающей регуляции при введении JNJ-372, который был характерен для РВМС, моноцитов и макрофагов, но не для НК-клеток. Например, обработка JNJ-372 привела к дозозависимому повышению уровней MCP-1 (ФИГ. 38) и MCP-3 (ФИГ. 39) в присутствии РВМС или моноцитов, чего не наблюдалось с изотипом или JNJ-372.IgG2sigma или в присутствии НК-клеток. IL1-RA, который секретируется моноцитами и макрофагами в ответ на активирующие стимулы (Janson *с*

соавт., *J Immunol* 147:4218-23, 1991; Arend *с соавт.*, *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1: i60-4, 2000) увеличивался в зависимости от дозы при введении JNJ-372 в присутствии РВМС и моноцитов, но не NK-клеток (**ФИГ. 40**). Кроме того, дозозависимое повышение уровней МР1 β наблюдали при введении JNJ-372, но не при использовании изотипического контроля или JNJ-372.IgG2sigma в присутствии иммунных клеток (**ФИГ. 41**). Также обнаружена активация обоих белков семейства МР: МР1 и МР1 α после обработки JNJ-372 при совместном культивировании с макрофагами М1 и М2, при этом кратное изменение МР1 β было выше с макрофагами М2с. На **ФИГ. 42** показана кривая зависимости доза-эффект для уровней МР-1 β в клетках Н1975, культивированных в присутствии макрофагов М1. На **ФИГ. 43** показана кривая зависимости доза-эффект для уровней МР-1 β в клетках Н1975, культивированных в присутствии макрофагов М2. На **ФИГ. 44** показана кривая зависимости доза-эффект для уровней МР-1 α в клетках Н1975, культивированных в присутствии макрофагов М1. На **ФИГ. 45** показана кривая зависимости доза-эффект для уровней МР-1 α в клетках Н1975, культивированных в присутствии макрофагов М2.

Чтобы оценить влияние секретируемых хемокинов на подавление EGFR/cMet, кондиционированную среду от клеток Н1975, обработанных изотипическим контролем, JNJ-372 или JNJ-372, IgG2sigma в присутствии или отсутствии РВМС в течение 4 или 72 часов переносили на необработанные Н1975 и оценивали изменения пути EGFR и cMet. Измеримого снижения уровней белков EGFR, pEGFR и c-Met в присутствии кондиционированных сред не наблюдалось ни в один момент времени (данные не показаны). Это позволяет предположить, что секретируемых цитокинов и хемокинов было недостаточно для индукции усиленного подавления EGFR/cMet, поскольку для этого требуется опосредованный антителами прямой контакт между опухолевыми и иммунными клетками.

Пример 9. Взаимодействие Fc JNJ-372 с моноцитами и макрофагами индуцирует трогоцитоз (ADCT)

Другая ключевая эффекторная функция Fc, трогоцитоз (ADCT), оценивалась с помощью анализа на основе проточной цитометрии, измеряющего перенос меченого антитела, связанного с клетками-мишенями, в эффекторные клетки (макрофаги). Клетки Н1975 NucLight Red опсонизировали изотипом, меченым AF488, JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma, совместно культивировали с макрофагами М1 или М2с, и оценивали процентное содержание макрофагов AF488+. Меченый JNJ-372 был перенесен дозозависимым образом как на макрофаги М1 (**ФИГ. 46**), так и на макрофаги М2с (**ФИГ. 47**), тогда как в макрофагах CD11b+ не был обнаружен ни изотипический контроль, ни антитело, меченное JNJ-372.IgG2sigma (данные не показаны). Никаких заметных макрофагов NucLight Red+ обнаружено не было, что указывает на отсутствие фагоцитоза. Это позволяет предположить, что преобладающим механизмом в данном анализе является трогоцитоз.

Для визуального подтверждения JNJ-372-индуцированного макрофагального

трогоцитоза была проведена покадровая микроскопия, при которой макрофаги были визуализированы с помощью смеси антител CD11b/CD14 и окрашены по Хехсту для ядер, а клетки-мишени H1975 были идентифицированы по их ядрам NuLight Red+. Клетки-мишени H1975 опсонизировали AF647-меченным изотипом, антителами JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma, совместно культивировали с макрофагами M1 или M2c и получали высокоинформативные конфокальные изображения. При сокультивировании с клетками-мишенями, опсонизированными меченым JNJ-372, в макрофагах M1 и M2 наблюдалось дискретное накопление AF647+PANTA (JNJ-372), тогда как при обработке меченым изотипом или JNJ-372.IgG2sigma оно не наблюдалось. Как и в предыдущем анализе, в этих анализах наблюдали минимальный фагоцитоз, что указывает на то, что преобладающим механизмом снижения секреции рецепторов JNJ-372 является трогоцитоз. На **ФИГ. 48** показаны репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения через 11 мин и 44 мин культивирования. На **ФИГ. 49** показаны репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения через 77 мин и 110 мин культивирования.

Затем была исследована способность моноцитов к трогоцитозу. Как и в случае макрофагов, моноциты, сокультивированные с опсонизированными JNJ-372 (меченым AF647) о клетками-мишенями продемонстрировали специфический перенос меченого антитела JNJ-372 в моноциты (данные не показаны). Наконец, для моделирования взаимодействий антител в микроокружении опухоли, совместную культуру макрофагов M1 или M2c и клеток-мишеней H1975 с изотипом, меченым AF647, обрабатывали антителами JNJ-372 или JNJ-372.IgG2sigma. В этих условиях изотипический контроль связывается только с макрофагами M1 и M2c, JNJ-372.IgG2sigma - только с клетками-мишенями, тогда как JNJ-372 связывается как с клетками-мишенями, так и с макрофагами (данные не показаны), тем самым подтверждая специфичность связывания каждого антитела. JNJ-372-опосредованный трогоцитоз также легко возникал в условиях совместного культивирования, что измеряли по четкому переносу в макрофаги меченого антитела JNJ-372, но не изотипа или антител JNJ-372.IgG2sigma.

Полученные результаты в совокупности показывают, что JNJ-372 индуцирует трогоцитоз за счет взаимодействия с Fc γ рецепторами на макрофагах и моноцитах.

Обсуждение

Эксперименты, описанные в настоящем документе, показали, что биспецифическое антитело к EGFR/c-Met, JNJ-372, имело множество Fc-зависимых механизмов, которые способствовали его противоопухолевой эффективности. Помимо индукции ADCC, опосредованной NK-клетками, взаимодействие JNJ-372 с рецепторами Fc γ на иммунных клетках также опосредовало подавление рецепторных тирозинкиназ EGFR и cMet и их фосфорилированных форм через трогоцитоз. Этой новой функции Fc способствовали моноциты и макрофаги, которые также необходимы для противоопухолевой эффективности *in vivo*.

Было показано, что для антипролиферативного и апоптозного эффектов *in vitro* и для противоопухолевой эффективности *in vivo* необходимы взаимодействия Fc JNJ-372 с иммунными клетками. Учитывая, что максимальный антипролиферативный эффект наблюдался через 48 часов или позже, а ADCC происходит раньше (от ~2 до 4 часов (29)) *in vitro*, предполагалось, что вклад ADCC в общее уничтожение опухолевых клеток может быть минимальным. Хотя в проанализированных клеточных линиях активность CDC не оценивалась, известно, что клеточные линии НМРЛ экспрессируют белки, ингибирующие комплемент, CD46, CD55 и CD59 (Varsano *с соавт.*, *Clin Exp Immunol* 113: 173-82, 1998). Это позволяет предположить, что, хотя JNJ-372 не индуцировал CDC в исследуемых клетках, биспецифическое антитело может быть способно индуцировать CDC активность в других клеточных линиях или опухолевых типах. Наконец, хотя ранее сообщалось, что JNJ-372 индуцировал ADCP *in vitro* (Moore *с соавт.*, *Cancer Res* 76: 3942-53, 2016) в условиях, используемых для анализов трогоцитоза на основе проточной и конфокальной микроскопии в этом исследовании, не наблюдалось минимального ADCP или его отсутствия. Эти результаты свидетельствуют о том, что JNJ-372 функционирует за счет множества механизмов действия, и что вклад каждой из этих эффекторных функций Fc у разных пациентов может варьироваться.

Было также продемонстрировано, что JNJ-372 индуцировал ADCR, и исследование функций цитокинов, активируемых JNJ-372, показало, что большинство из них принадлежит к семейству хемотаксических цитокинов, называемых хемокинами, в частности хемокинов ХЦ (Graves *с соавт.*, *Crit Rev Oral Biol* 6: 109-18, 1995; Balkwill, *Nat Rev Cancer* 4: 540-50, 2004). Хемокины ХЦ состоят из двух основных подсемейств: моноцитарного хемоаттрактного белка (MCP) и макрофагального белка воспаления (MIP), которые, как известно, функционируют в качестве хемоаттрактантов для клеток врожденного иммунитета, таких как моноциты и макрофаги (Ugucioni *с соавт.*, *Eur J Immunol* 25: 64-8, 1995; В публикации Loetscher *с соавт.*, *FASEB J* 8: 1055-60, 1994). Было показано, что члены семейства MCP-1 (CCL2) и MCP-3 (CCL7) повышают рекрутинг воспалительных моноцитов и Т-лимфоцитов CD8⁺ (Ugucioni *с соавт.*, *Eur J Immunol* 25: 64-8, 1995; В публикации Loetscher *с соавт.*, *FASEB J* 8: 1055-60, 1994; Jia *с соавт.*, *J Immunol* 180: 6846-53, 2008). Также согласно имеющимся данным, MCP-1 и MIP1 β (CCL4) индуцируют рекрутирование моноцитов и макрофагов в микроокружение опухоли (ТМЕ) при НМРЛ (Ugucioni *с соавт.*, *Eur J Immunol* 25: 64-8, 1995; Arenberg *с соавт.*, *Cancer Immunol Immunother* 49: 63-70, 2000).

Хотя эти цитокины могут притягивать иммунные клетки в ТМЕ и активировать их, необходимость в опосредованном антителами клеточном контакте и индуцировании трогоцитоза свидетельствует о том, что механизм, опосредованный взаимодействием Fc JNJ-372, опосредовал подавление сигнализации EGFR и c-Met посредством моноцитарного или макрофагального трогоцитоза. В нескольких недавних работах было показано, что аналогичный перенос рецепторов Her2 в иммунные клетки, такие как макрофаги и нейтрофилы, посредством трогоцитоза приводит к гибели опсонизированных

терапевтическими антителами опухолевых клеток (Velmurugan *с соавт.*, *Mol Cancer Ther* 15: 1879-89, 2016; Matlung *с соавт.*, *Cell Transplantation* 23: 3946-59, 2018). Это позволяет предположить, что, хотя ранее трогицитоз считался механизмом резистентности к антителам, таким как ритуксимаб, он также может служить эффекторной функцией Fc для опосредования противоопухолевых эффектов (Taylor and Lindfer, *Blood* 125: 762-6, 2015; Pham *с соавт.*, *PLoS One* 6: e14498, 2011).

В заключение было показано, что JNJ-372 демонстрирует множество различных механизмов действия, при этом несколько Fc-зависимых и Fc-независимых функций вносят свой вклад в противоопухолевую активность. Модели *in vitro* и *in vivo* показали, что для снижения экспрессии EGFR/Met и противоопухолевой эффективности требуется взаимодействие JNJ-372 с FcR γ на моноцитах и макрофагах, указывая на то, что уровни этих иммунных клеток могут прогнозировать эффективность JNJ-372 в клинических условиях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR, с-Met или EGFR и с-Met, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) в комбинации с агентом, усиливающим активность макрофагов у пациента.

2. Способ по п. 1, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит:

а) первый домен, который связывает EGFR, причем первый домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; и

б) второй домен, который связывается с-Met, причем второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12:

3. Способ по п. 2, в котором

а) первый домен, который связывает EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 13 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14; и

б) второй домен, который связывает с-Met, содержит VH из SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met является изотипом IgG1.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 17, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 19 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 20.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором агент, усиливающий активность макрофагов, представляет собой GM-CSF, антитело к CD47, ингибитор HDAC2, ингибитор оси PD-(L)1 или агонист CD11b.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором рак, экспрессирующий EGFR или с-Met, связан с EGFR дикого типа, активирующей мутацией EGFR, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, с-Met дикого типа, активирующей мутацией гена с-Met, амплификацией гена с-Met или мутацией KRAS.

8. Способ по п. 7, в котором активирующая мутация гена EGFR содержит замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746-A750, делецию R748-P753, инсерцию Ala (A) между M766 и A767, инсерцию Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, инсерцию Asn и Ser (NS) между P772 и H773, инсерцию одной или более аминокислот

между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, или одну или более делеций или одну и более инсерций в экзоне 20 EGFR, или любую их комбинацию.

9. Способ по п. 7, в котором мутация KRAS имеет замену G12V, G12C, G12A или G12D или любую их комбинацию.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором у пациента имеется впервые диагностированный рак, экспрессирующий EGFR или с-Met.

11. Способ по любому из пп. 1-9, в котором пациент устойчив или приобрел устойчивость к предшествующей противораковой терапии.

12. Способ по п. 11, в котором предшествующая противораковая терапия представляет собой химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

13. Способ по п. 12, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, с-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

14. Способ по п. 13, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором рак, экспрессирующий EGFR, с-Met или EGFR и с-Met, представляет собой эпителиально-клеточный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, рак влагалища, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC).

16. Способ по любому из пп. 1-15, включающий дополнительное получение пациентом одной или более противораковых терапий.

17. Способ по п. 16, где один или более видов противораковой терапии содержат химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

18. Способ по п. 17, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, с-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

19. Способ по п. 18, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

20. Способ диагностики и лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR, с-

Met или EGFR и c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий:

- а) получение биологического образца испытуемого;
- б) измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце;
- г) диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения; и
- д) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным ответом на лечение антителом к EGFR/c-Met.

21. Способ лечения пациента, с подозрением на наличие или с диагностированным раком, экспрессирующим EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий:

- а) определение того, что у пациента уровни макрофагов или моноцитов выше порогового значения; и
- б) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту, у которого, как определено, уровень макрофагов или моноцитов выше порогового значения.

22. Способ прогнозирования ответа пациента с раком, экспрессирующим EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий

- а) получение биологического образца испытуемого;
- б) измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце;
- в) прогнозирование у пациента наличия ответа на лечение, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

23. Способ лечения пациента с раком, экспрессирующим EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, который отвечает на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met,

- а) получение биологического образца испытуемого;
- б) измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце;
- в) лечение пациента биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, когда уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения.

24. Способ определения того, отвечает ли пациент с раком, экспрессирующим EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met и определение, следует ли лечить пациента, включающий:

- а) получение биологического образца испытуемого;
- б) измерение уровней макрофагов или моноцитов в биологическом образце;
- в) диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, отвечающего на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни макрофагов или моноцитов в биологическом образце выше порогового значения, или диагностирование у пациента рака, экспрессирующего EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, не отвечающего на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, если уровни

макрофагов или моноцитов в биологическом образце ниже порогового значения; и

г) введение биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным ответом на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met или отказ от введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met пациенту с диагностированным отсутствием ответа на лечение биспецифическим антителом к EGFR/c-Met.

25. Способ по любому из пп. 20-24, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит

а) первый домен, который связывает EGFR, причем первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; и

б) второй домен, который связывается с-Met, причем второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12;

26. Способ по п. 25, в котором

а) первый домен, который связывает EGFR, содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; и

б) второй домен, который связывает с-Met, содержит VH из SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

27. Способ по любому из пп. 20-26, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met является изотипом IgG1.

28. Способ по любому из пп. 20-27, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20;

29. Способ по любому из пп. 20-28, в котором пороговое значение соответствует 30-му перцентилю или выше количества макрофагов или моноцитов в биологических образцах, полученных от популяции пациентов с EGFR-, с-Met или EGFR и с-Met-положительным раком.

30. Способ по любому одному из пп. 20-29, в котором биологический образец представляет собой образец крови.

31. Способ по любому из пп. 20-29, в котором биологический образец представляет собой биоптат опухолевой ткани.

32. Способ по любому из пп. 20-31, в котором рак, экспрессирующий EGFR, с-Met или EGFR и с-Met, связан с EGFR дикого типа, активирующей мутацией EGFR, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, с-Met дикого типа, активирующей мутацией гена с-Met, амплификацией гена с-Met или мутацией KRAS или любой их комбинацией.

33. Способ по п. 32, в котором активирующая EGFR мутация содержит замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V,

V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746 - A750, делецию R748 - P753, инсерцию Ala (A) между M766 и A767, вставку Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, инсерцию Asn и Ser (NS) между P772 и H773, инсерцию одной или более аминокислот между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, одну или более делеций в экспоненте EGFR 20, или одну или более инсерций в экзоне EGFR 20, или любую их комбинацию.

34. Способ по п. 33, в котором мутация KRAS содержит замену G12V, G12C или G12A.

35. Способ по любому из пп. 20-34, в котором у пациента имеется подозрение на наличие или впервые диагностирован рак, экспрессирующий EGFR или c-Met.

36. Способ по любому из пп. 20-34, в котором пациент устойчив или приобрел устойчивость к предшествующей противораковой терапии.

37. Способ по п. 36, в котором предшествующая противораковая терапия представляет собой химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

38. Способ по п. 37, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

39. Способ по п. 38, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefitinиб, lapatinиб, vandetanиб, afatinиб, osimertиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

40. Способ по любому из пп. 20-39, в котором рак, экспрессирующий EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, представляет собой эпителиально-клеточный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, рак влагалища, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC).

41. Способ по любому из пп. 20-40, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в комбинации с агентом, усиливающим активность макрофагов.

42. Способ по п. 41, в котором агент, усиливающий активность макрофагов у пациента, представляет собой GM-CSF, антагонист CD47, антитело к CD47, ингибитор HDAC2, ингибитор оси PD-(L)1 или агонист CD11b.

43. Способ по любому из пп. 20-42, дополнительно включающий получение пациентом одной или более противораковых терапий.

44. Способ по п. 43, где один или более видов противораковой терапии содержат

химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

45. Способ по п. 44, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

46. Способ по п. 45, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

47. Способ по любому из пп. 1-46, в котором содержание фукозы в биспецифическом антителе к EGFR/c-Met составляет приблизительно 15% или менее.

48. Способ индукции трофоцитоза EGFR или c-Met или EGFR и c-Met от донорской клетки к акцепторной клетке, включающий приведение донорской клетки в контакт с биспецифическим антителом к EGFR/c-Met в течение времени, достаточного для индукции трофоцитоза от донорской клетки к акцепторной клетке.

49. Способ по п. 48, в котором донорская клетка представляет собой раковую клетку, экспрессирующую EGFR, c-Met или EGFR и c-Met.

50. Способ по п. 48 или 49, в котором акцепторная клетка представляет собой макрофаг или моноцит.

51. Способ по любому одному из пп. 48-50, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит

а) первый домен, который связывает EGFR, причем первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; и

б) второй домен, который связывает c-Met, причем второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12;

52. Способ по п. 51, в котором

а) первый домен, который связывает EGFR, содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; и

б) второй домен, который связывает c-Met, содержит VH из SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

53. Способ по любому из пп. 48-52, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met является изотипом IgG1.

54. Способ по любому из пп. 48-53, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

55. Способ по любому из пп. 49-54, в котором рак, экспрессирующий EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, связан с EGFR дикого типа, активирующей мутацией EGFR, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, c-Met дикого типа, активирующей мутацией гена c-Met, амплификацией гена c-Met или мутацией KRAS

или любой их комбинацией.

56. Способ по п. 55, в котором активирующая мутация гена EGFR содержит замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746-A750, делецию R748-P753, инсерцию Ala (A) между M766 и A767, инсерцию Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, инсерцию Asn и Ser (NS) между P772 и H773, инсерцию одной или более аминокислот между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, или одну или более делеций или одну и более инсерций в экзоне 20 EGFR, или любую их комбинацию.

57. Способ по п. 55, в котором мутация KRAS содержит замену G12V, G12C или G12A.

58. Способ по любому из пп. 48-56, в котором этап приведения в контакт проводят в условиях *in vitro*.

59. Способ по любому из пп. 48-56, в котором этап приведения в контакт включает введение пациенту биспецифического антитела к EGFR/c-Met.

60. Способ по п. 59, в котором у пациента рак, экспрессирующий EGFR, c-Met или EGFR и c-Met.

61. Способ по п. 59 или 60, в котором у пациента впервые диагностирован рак, экспрессирующий EGFR, c-Met или EGFR и c-Met.

62. Способ по п. 59 или 60, в котором пациент устойчив или приобрел устойчивость к предшествующей противораковой терапии.

63. Способ по п. 62, в котором предшествующая противораковая терапия представляет собой химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

64. Способ по п. 63, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

65. Способ по п. 63, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позитиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

66. Способ по любому из пп. 49-65, в котором раковая клетка, экспрессирующая EGFR, c-Met или EGFR и c-Met, получена из эпителиальных клеток, клеток рака молочной железы, рака яичников, рака легкого, НМРЛ, аденокарциномы легких, мелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, рака анального канала, рака предстательной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, рак глотки, рак носа, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака ротовой полости, рака языка, рака пищевода, рака влагалища, рака шейки матки, рака селезенки, рака яичка, рака желудка, рака тимуса, рака толстой кишки, рака щитовидной железы, рака печени, гепатоцеллюлярной

карциномы или спорадической или наследственной папиллярной почечно-клеточной карциномы.

67. Способ по любому из пп. 59-66, включающий дополнительное получение пациентом одной или более противораковых терапий.

68. Способ по п. 67, где один или более видов противораковой терапии содержат химиотерапию, таргетную противораковую терапию или ингибитор киназы.

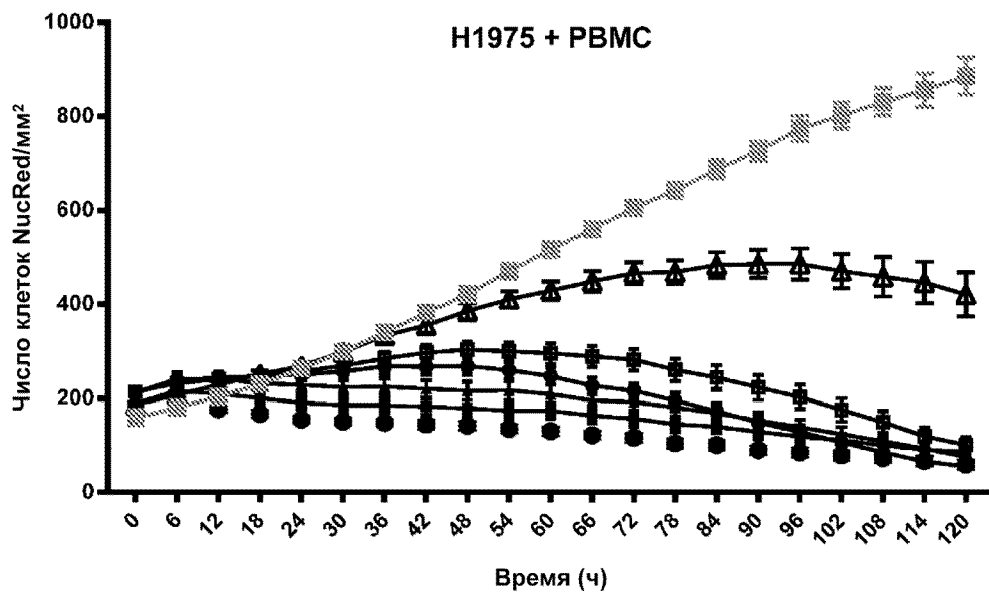
69. Способ по п. 68, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR или AXL.

70. Способ по п. 69, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefitinиб, lapatinиб, vandetanиб, afatinиб, osimertиниб, lazutinиб, позитиниб, криотиниб, cabozantinиб, capmatиниб, axitinиб, lenvatinиб, nintedanиб, regorafenиб, pazopanиб, sorafenиб или sunitиниб.

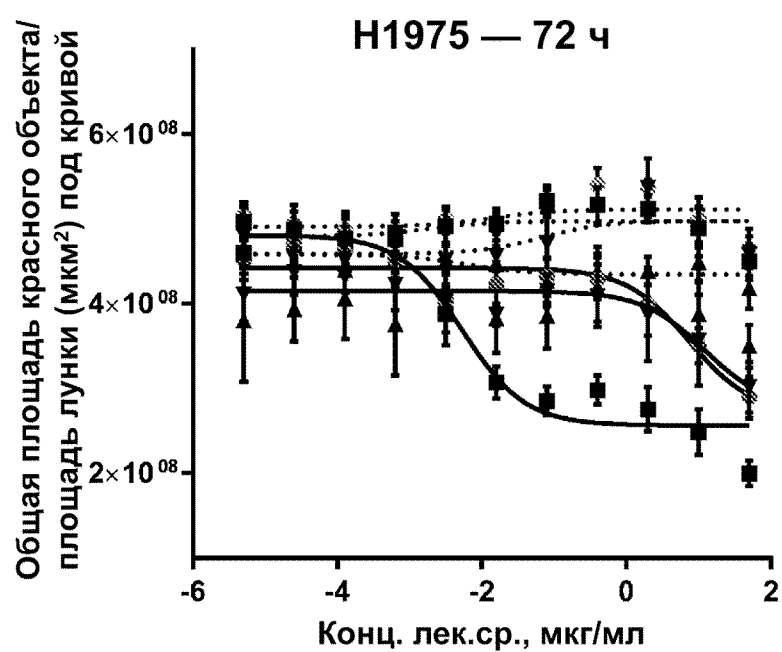
По доверенности

ФИГ. 1

- JNJ-372 50 мкг/мл
- JNJ-372 10 мкг/мл
- ▲ JNJ-372 2 мкг/мл
- JNJ-372 0,02 мкг/мл
- JNJ-372 3,2e-3 мкг/мл
- ▲ JNJ-372 1,28e-4 мкг/мл
- ▨ JNJ-372 0 мкг/мл

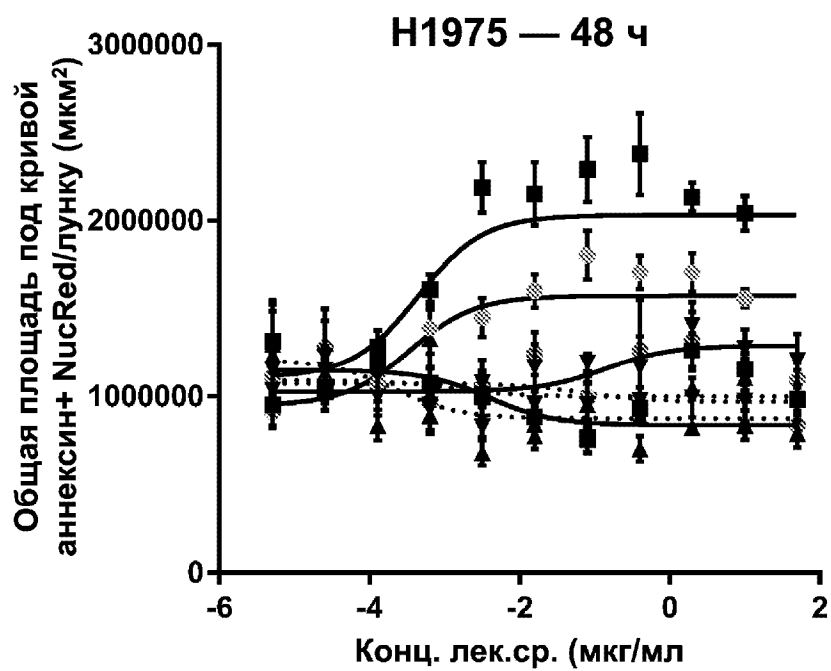


ФИГ. 3



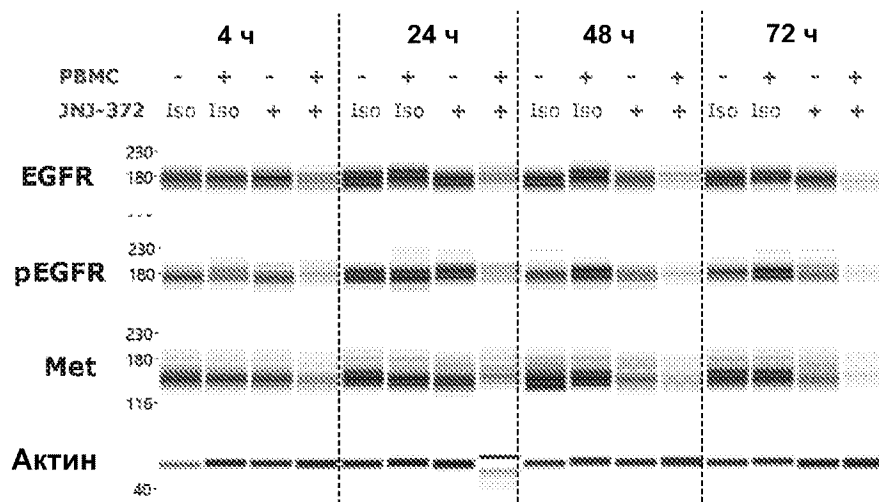
- H1975-JNJ372-без PBMC
- H1975-JNJ372 - PBMC-> IC50 = 0,0054 мкг/мл
- ▲• H1975-изо-без PBMC
- ▲ H1975-изо-PBMC
- ▼• H1975-IgG2-без PBMC
- ▼ H1975-IgG2-PBMC > IC50 = 12,1 мкг/мл
- ◆• H1975-EGFRxMet NF-без PBMC
- ◆ H1975-EGFRxMet NF-PBMC -> IC50 = 7,3 мкг/мл

ФИГ. 4

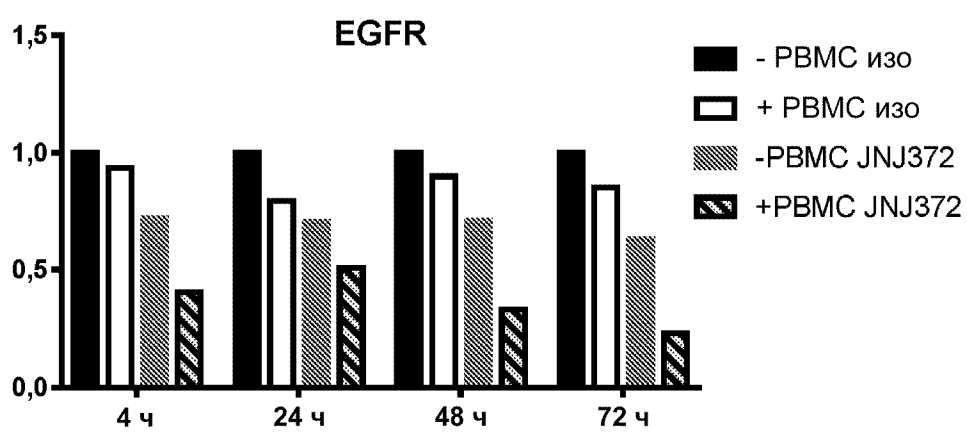


- H1975-JNJ372 - без PBMC
- H1975-JNJ372 - PBMC -> IC50 = 0,0066 µкг/мл
- ▲• H1975-изо-без PBMC
- ▲ H1975-изо-PBMC
- ▼• H1975-IgG2-без PBMC
- ▼ H1975-IgG2s-PBMC -> IC50= 17,63 µкг/мл
- ◆• H1975-EGFRxMet NF-без PBMC
- ◆ H1975-EGFRxMet NF - PBMC-> IC50 = 5,403 µкг/мл

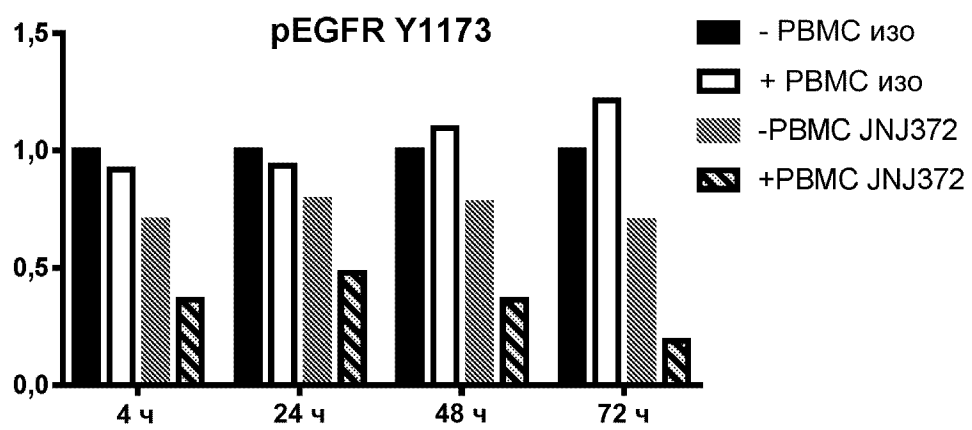
ФИГ. 5



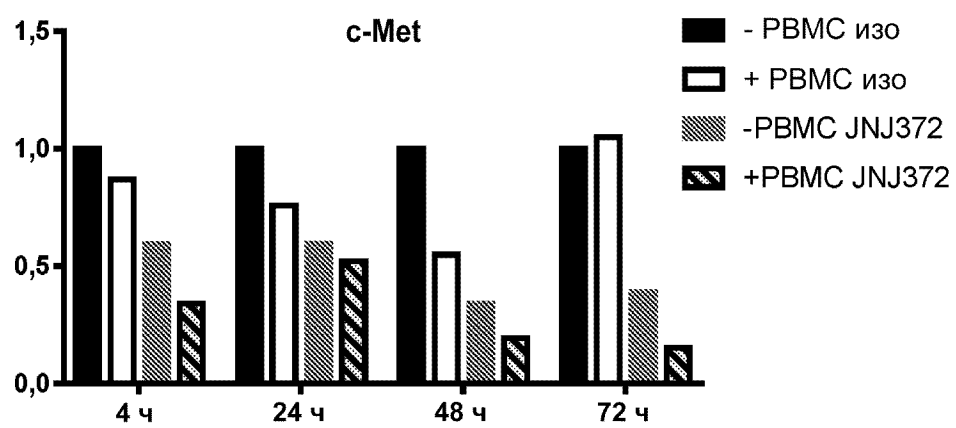
ФИГ. 6



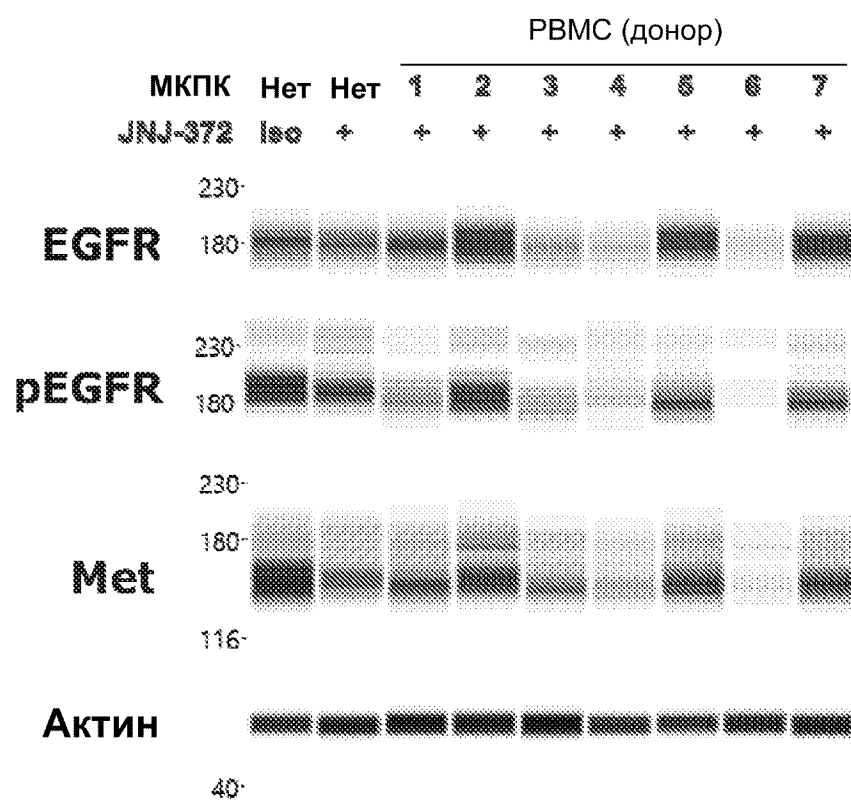
ФИГ. 7



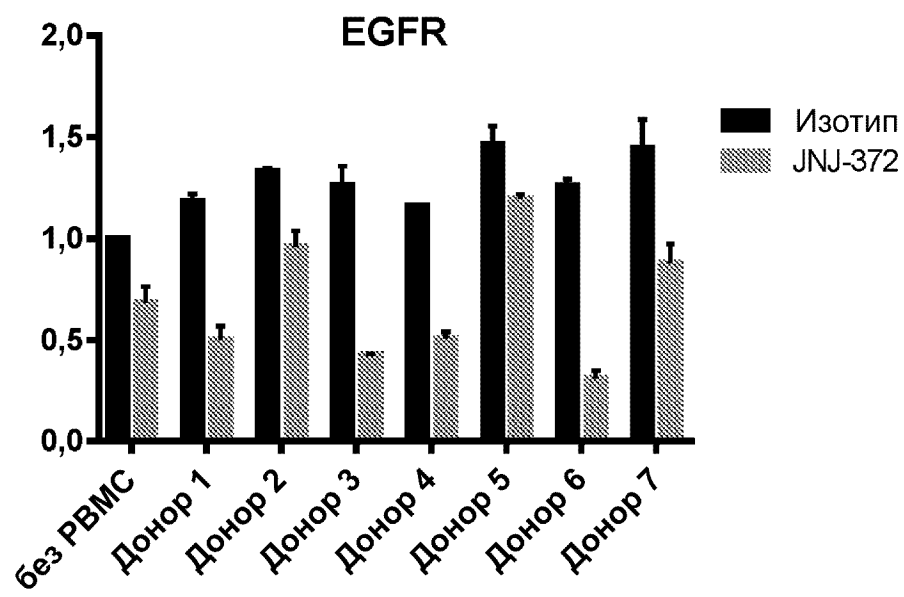
ФИГ. 8



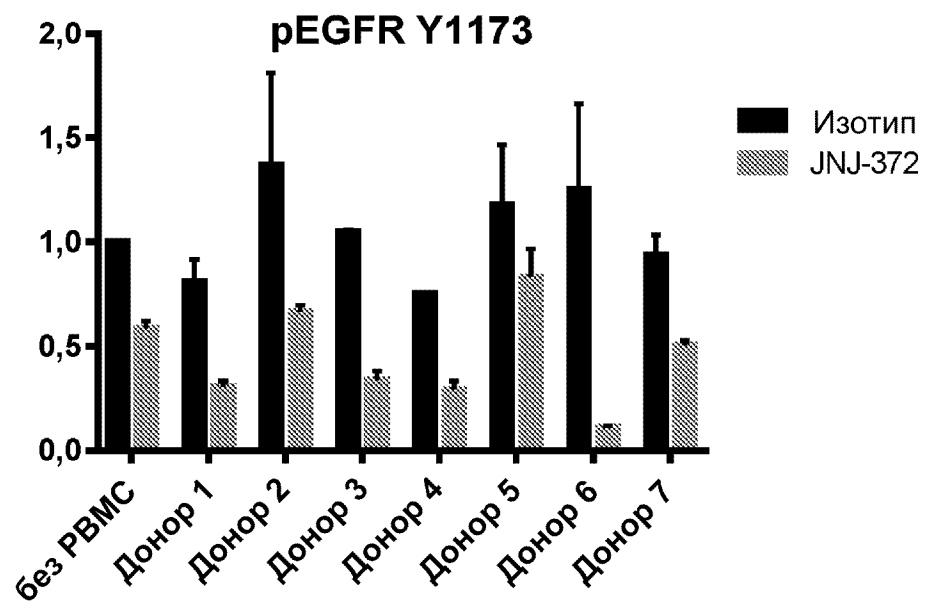
ФИГ. 9



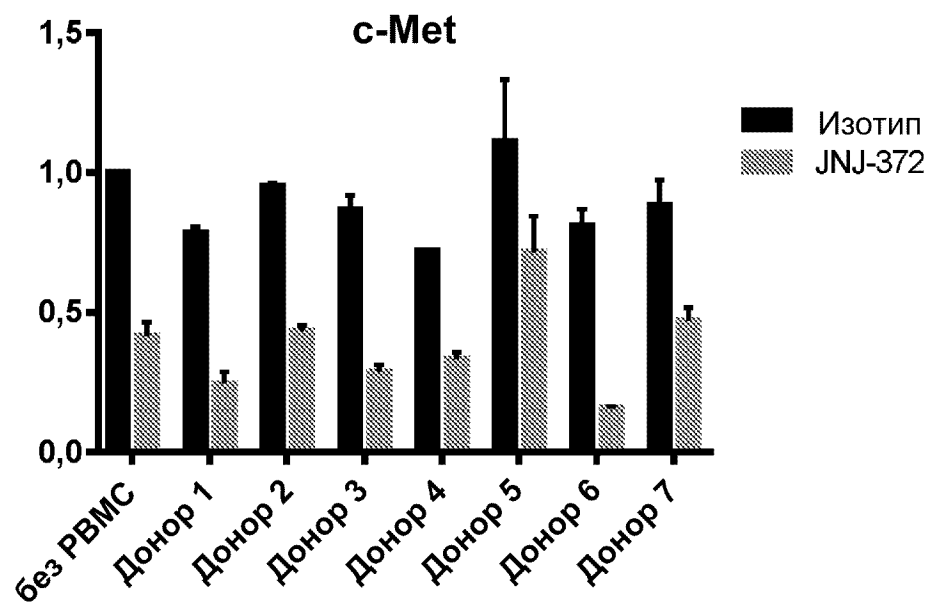
ФИГ. 10



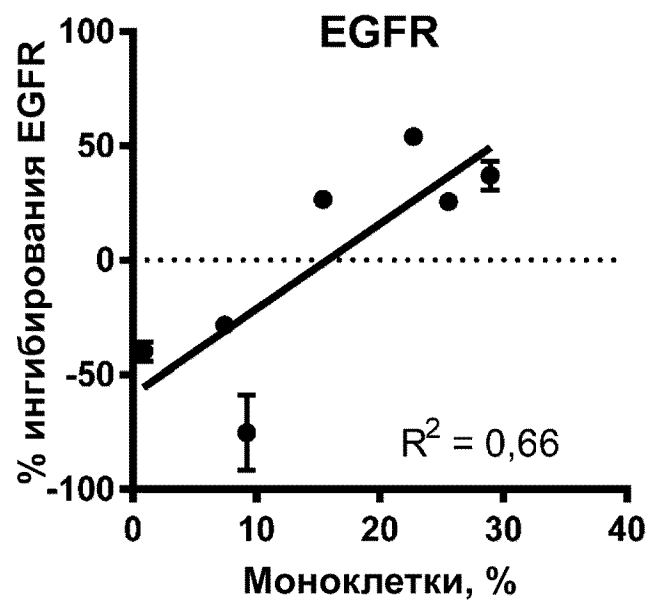
ФИГ. 11



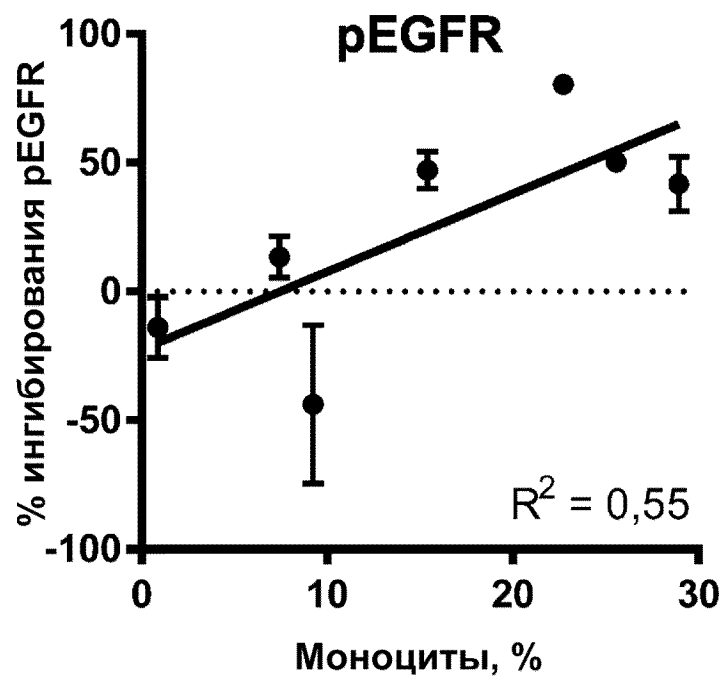
ФИГ. 12



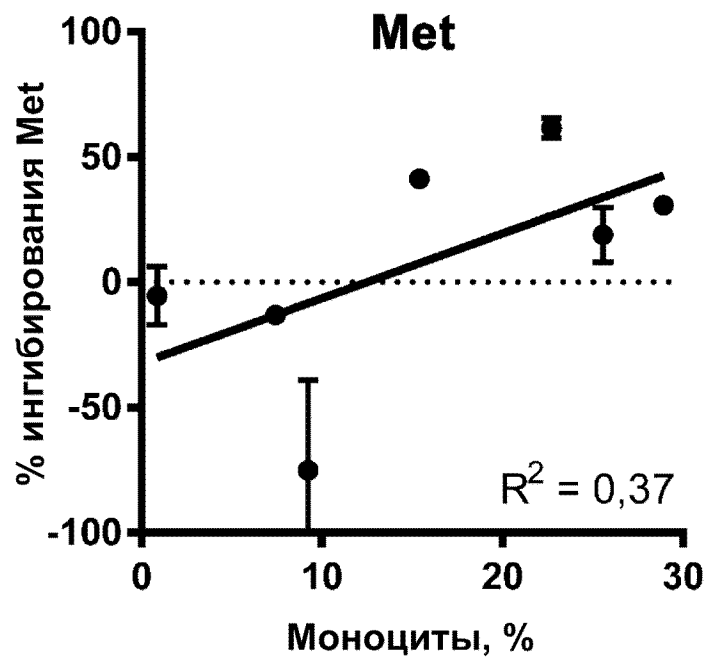
ФИГ. 13



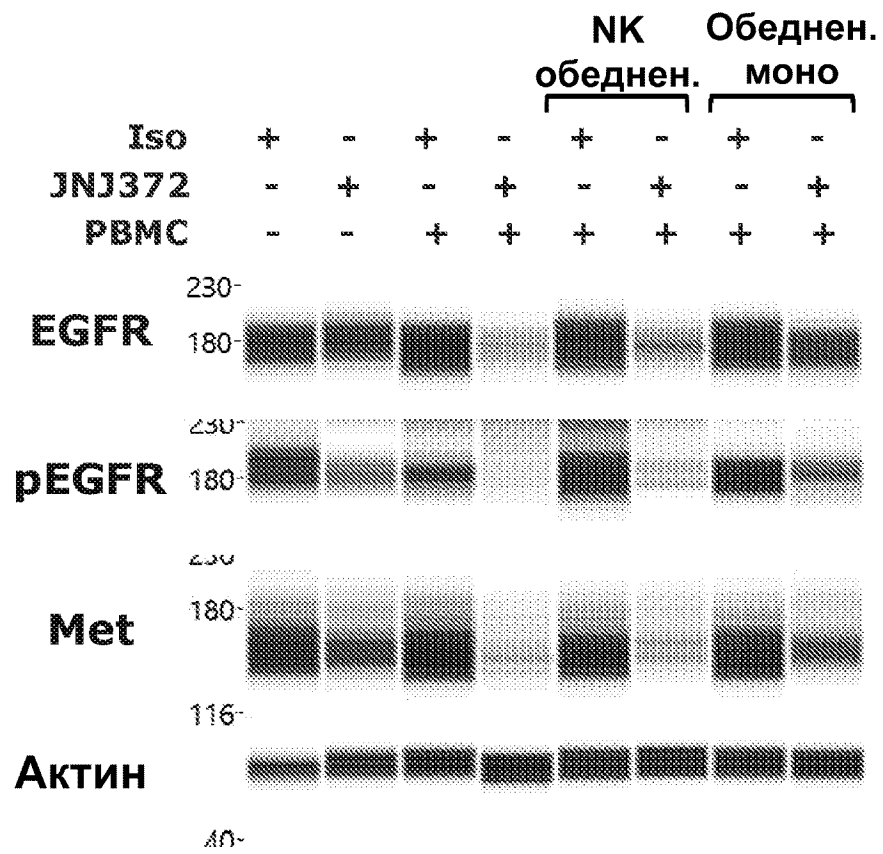
ФИГ. 14



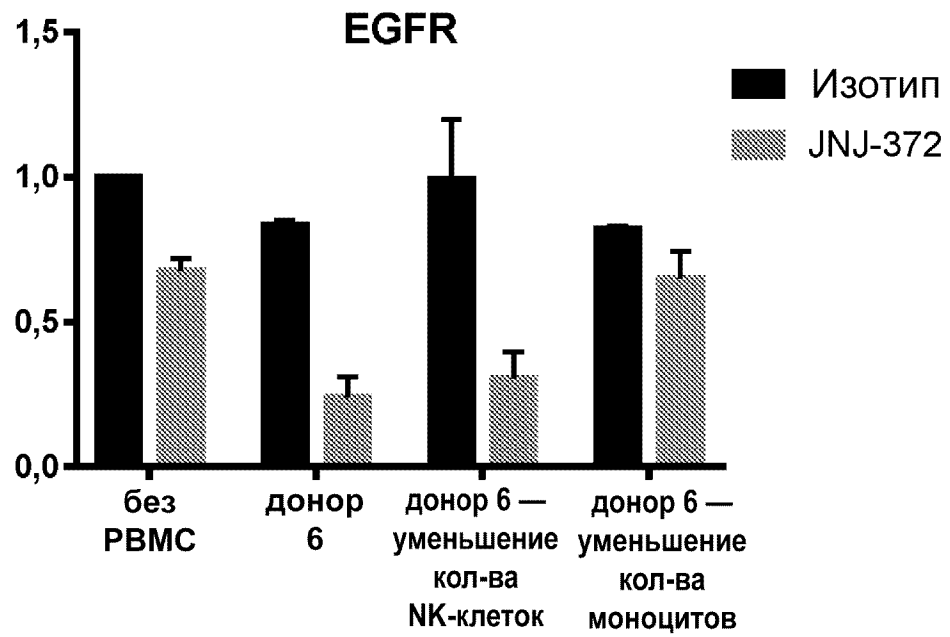
ФИГ. 15



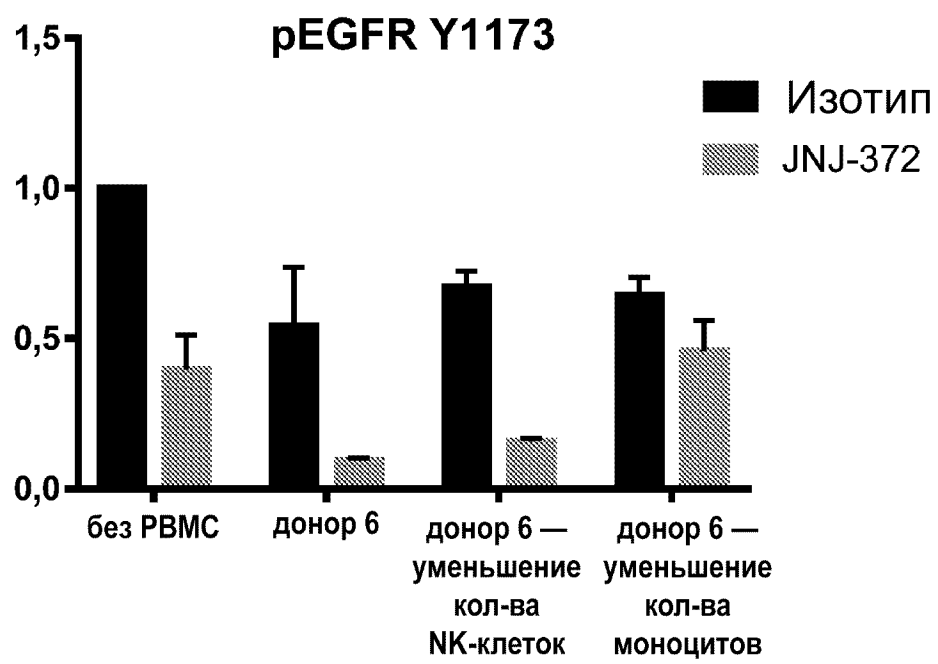
ФИГ. 16



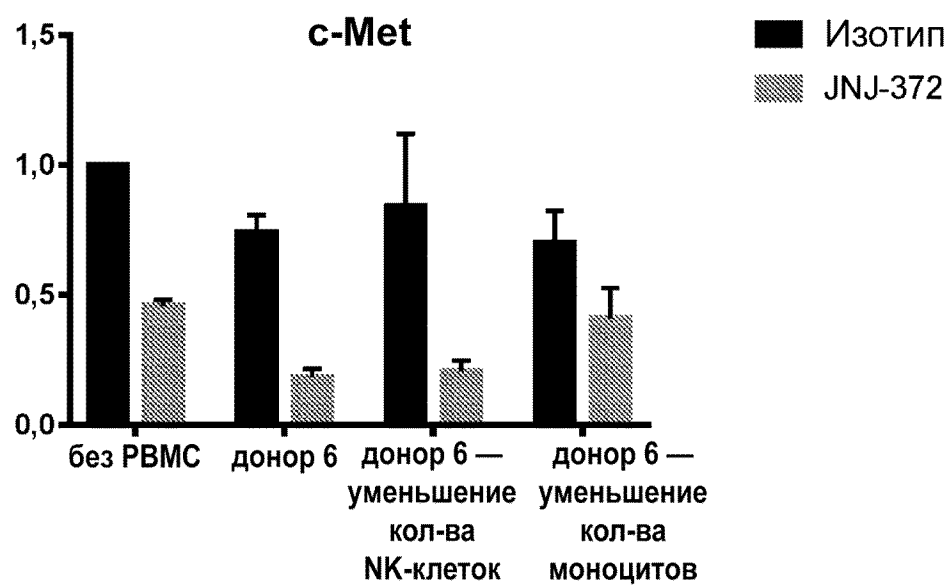
ФИГ. 17



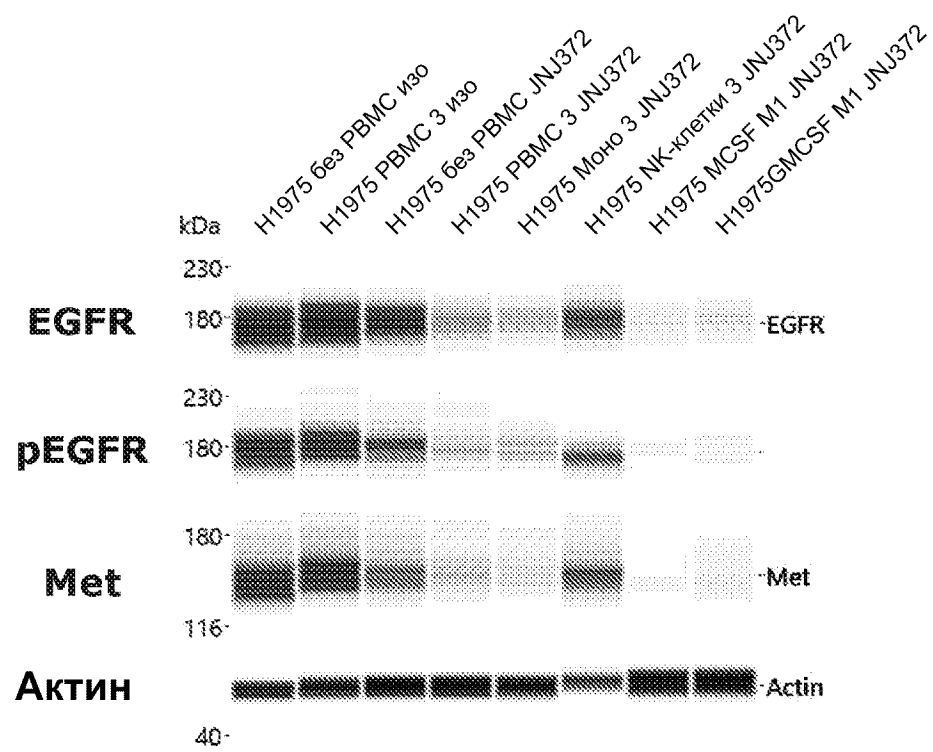
ФИГ. 18



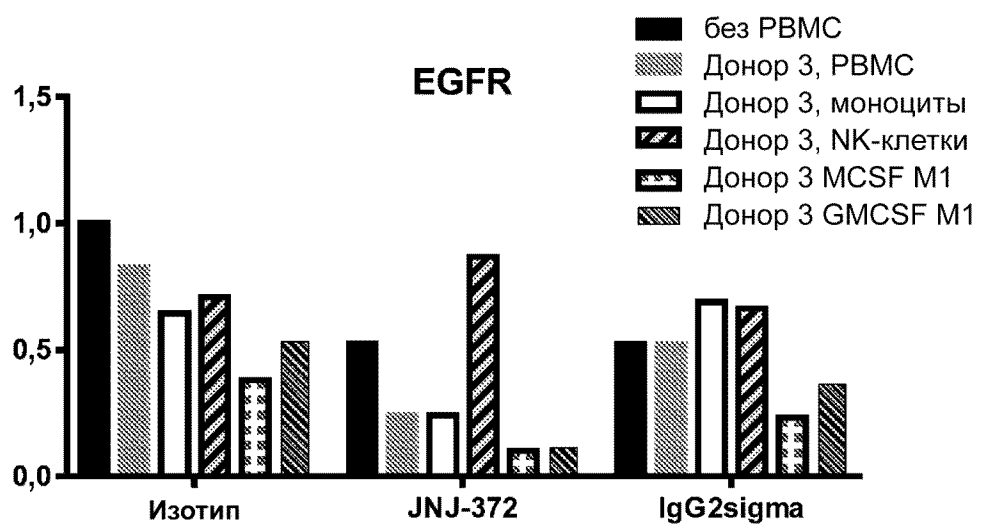
ФИГ. 19



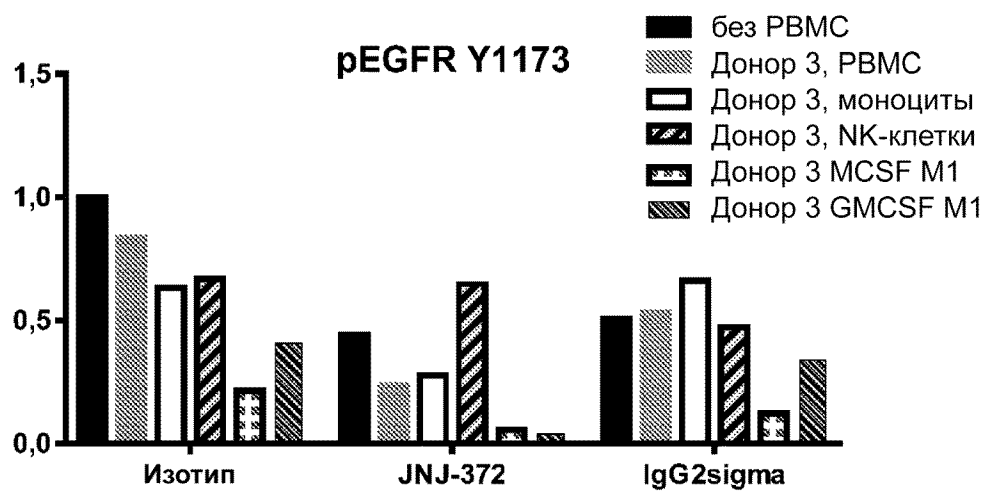
ФИГ. 20



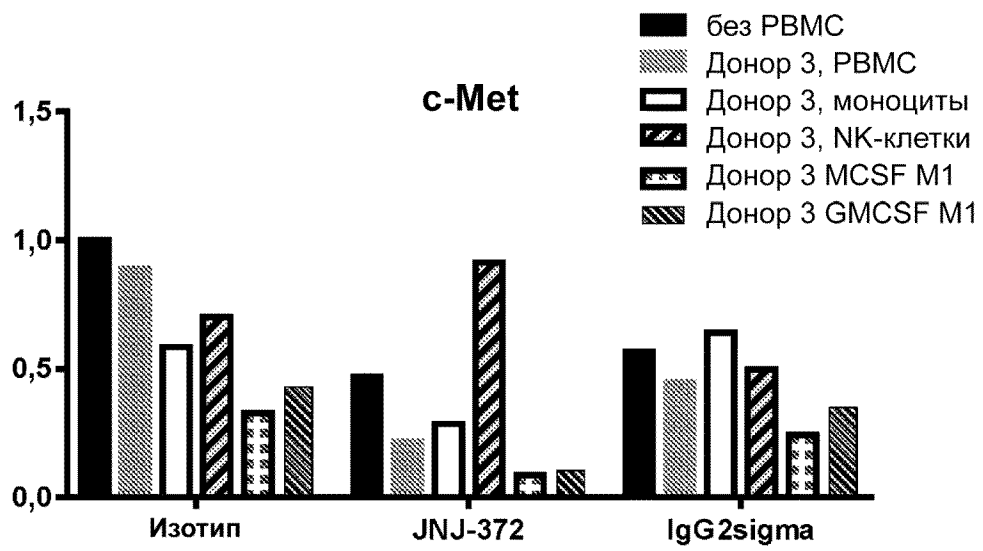
ФИГ. 21



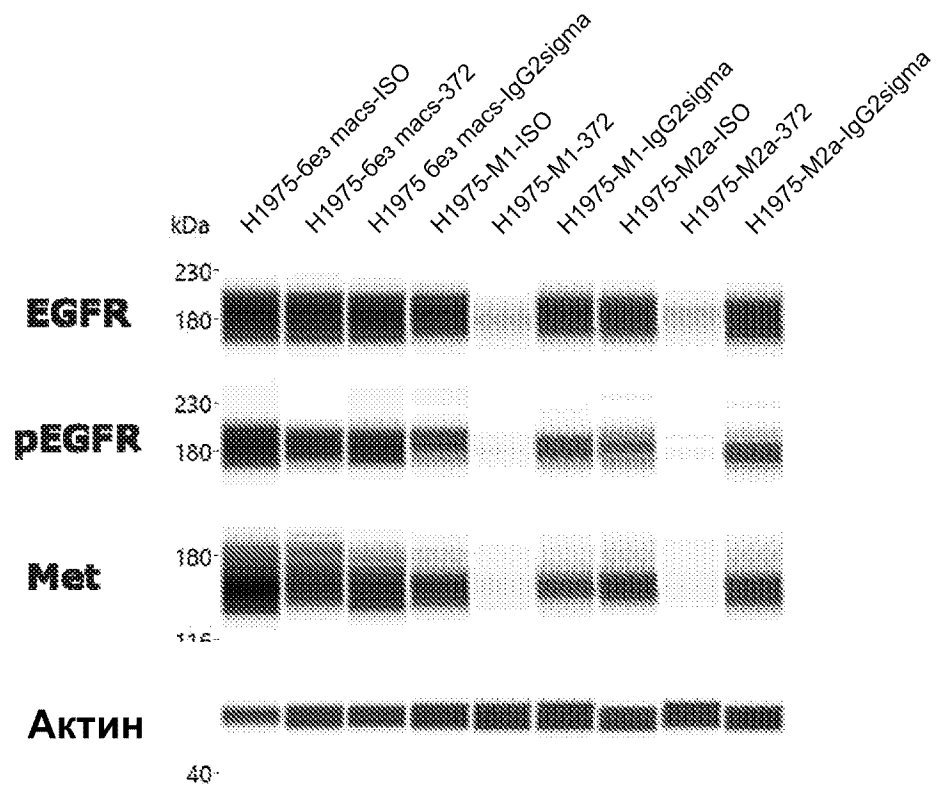
ФИГ. 22



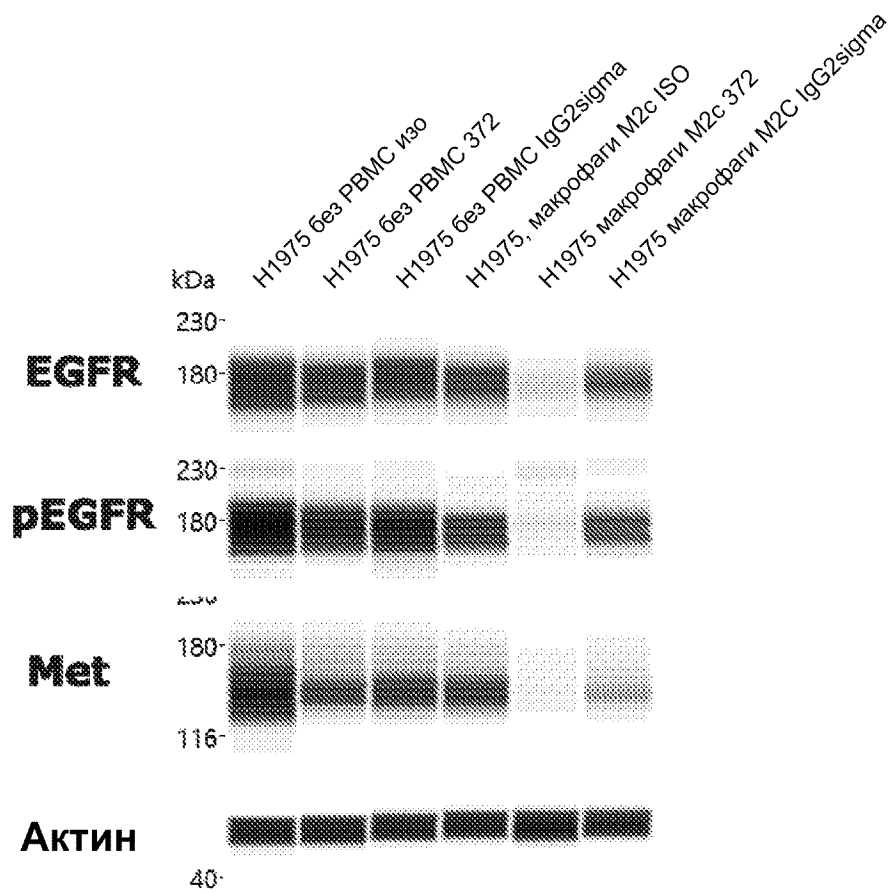
ФИГ. 23



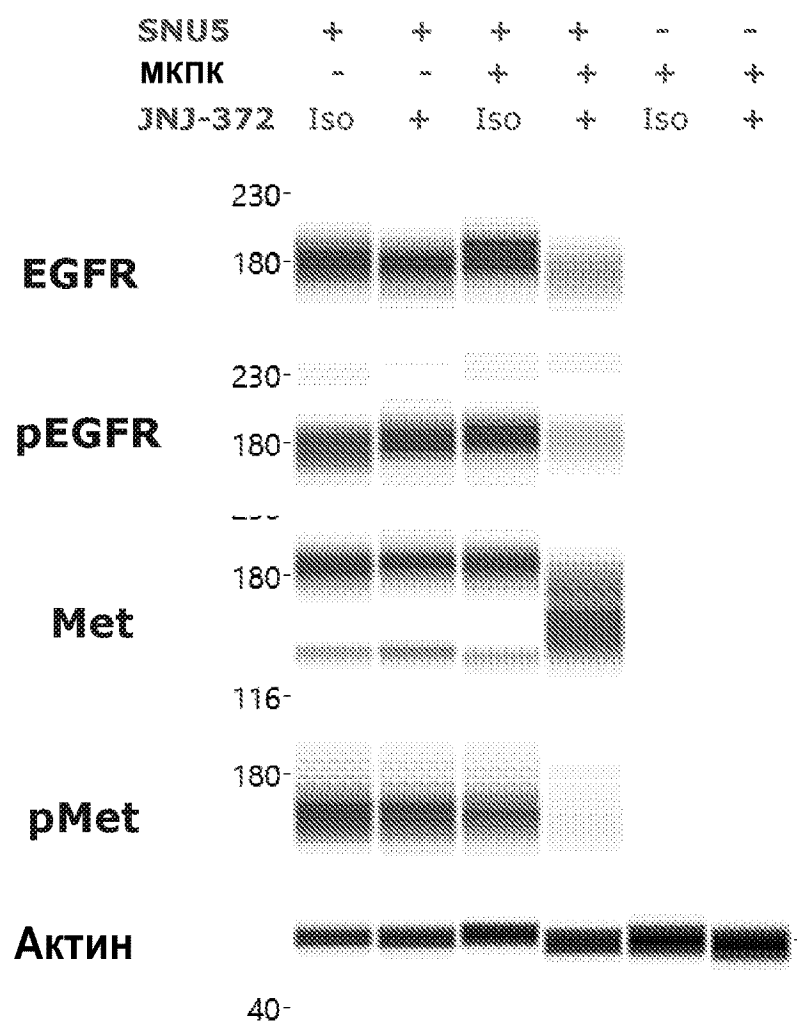
ФИГ. 24



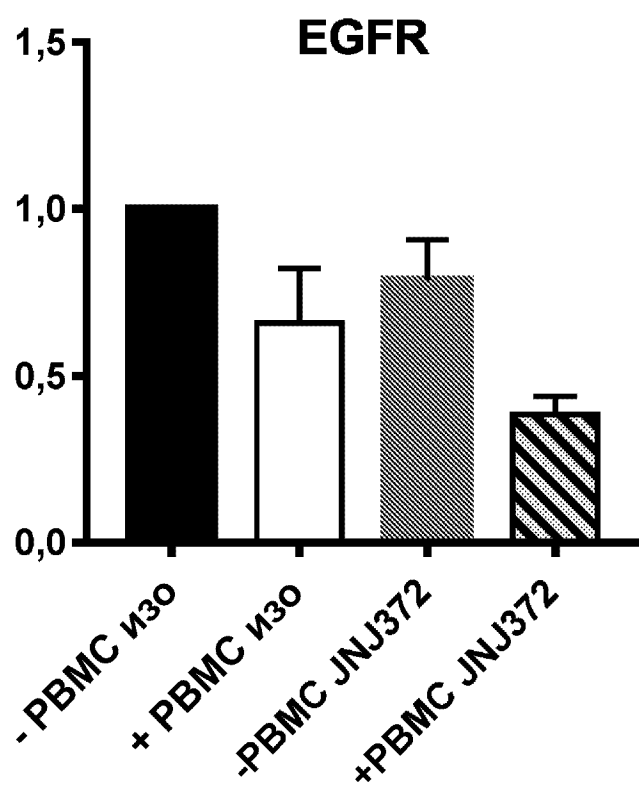
ФИГ. 25



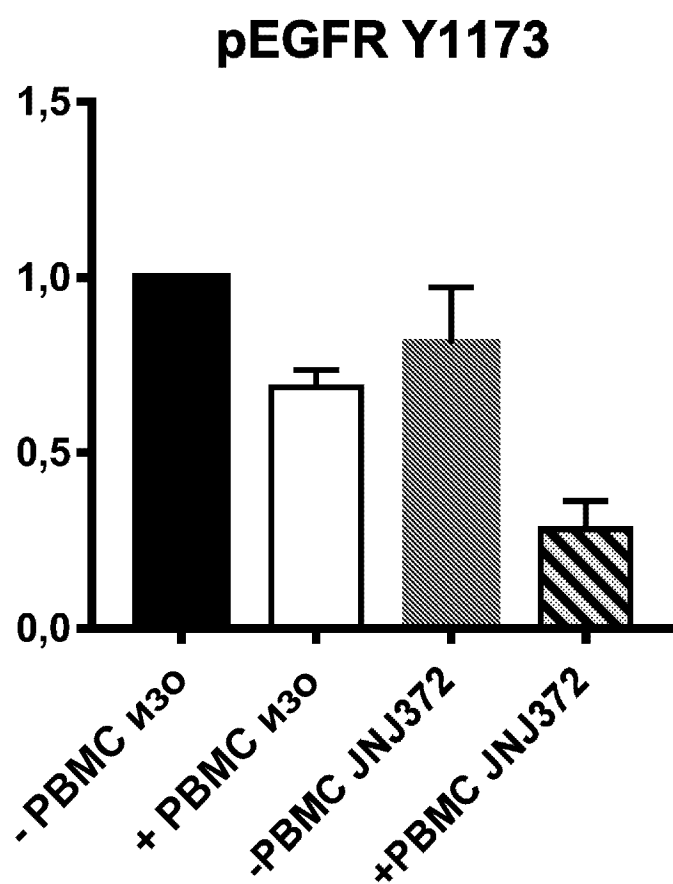
ФИГ. 26



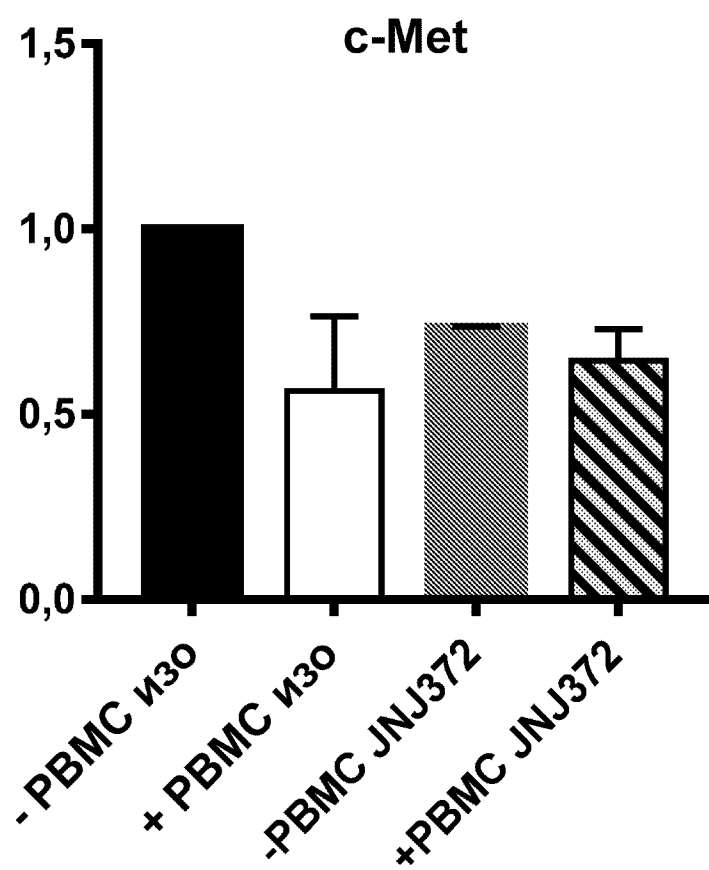
ФИГ. 27



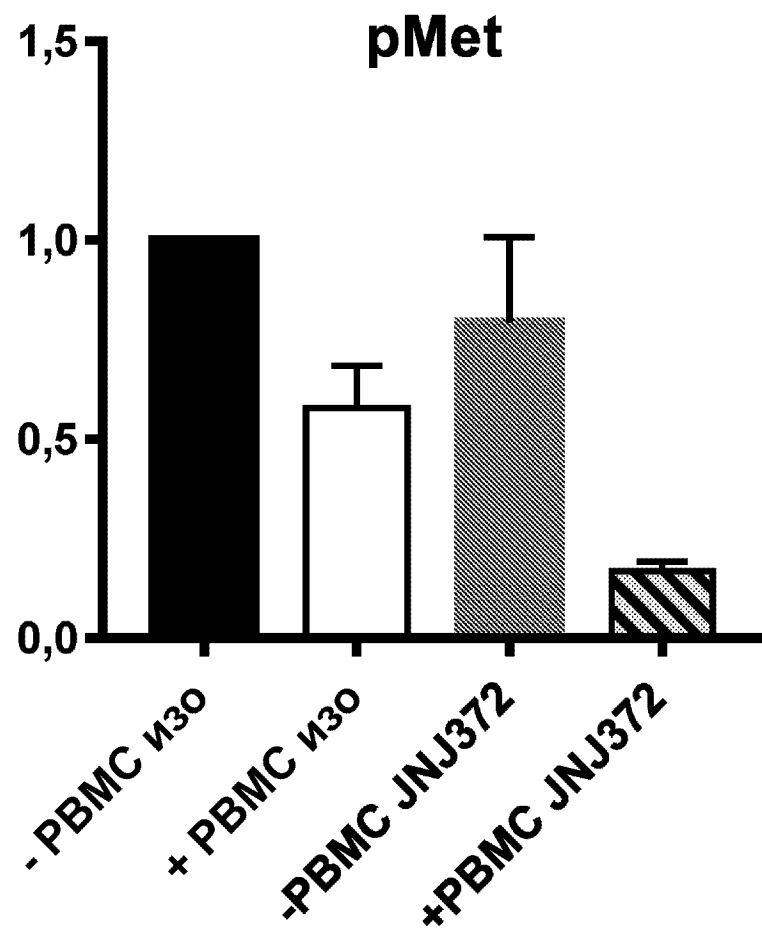
ФИГ. 28



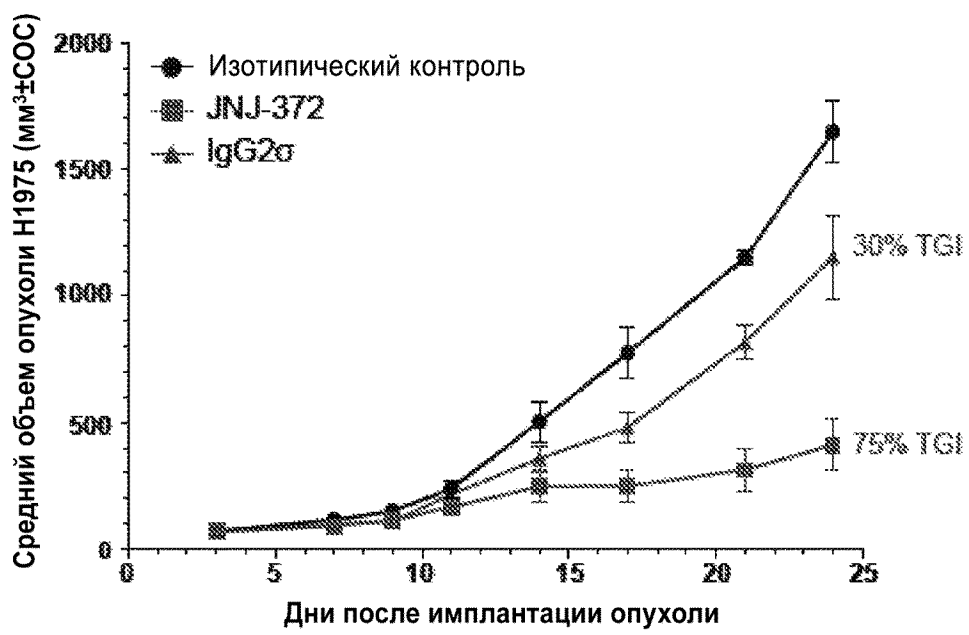
ФИГ. 29



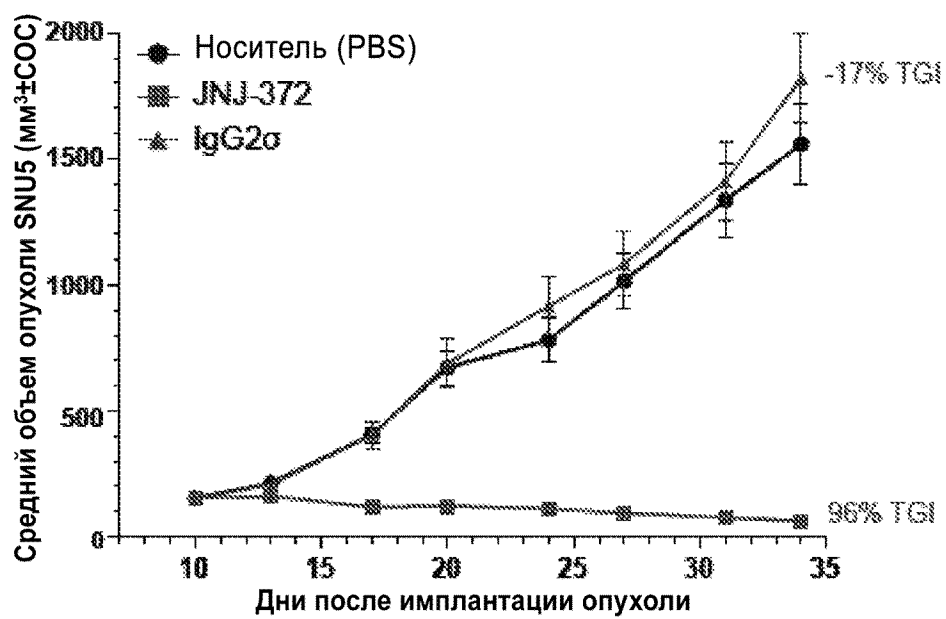
ФИГ. 30



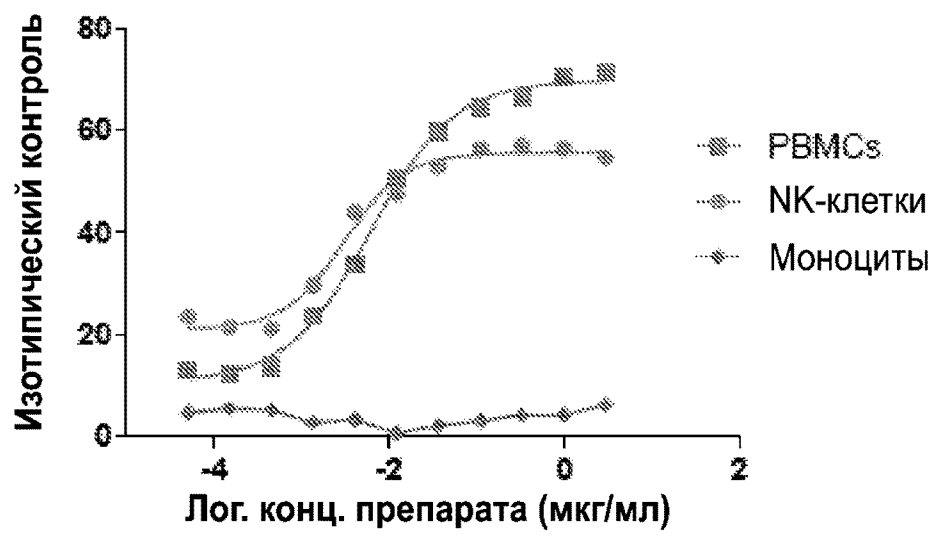
ФИГ. 31



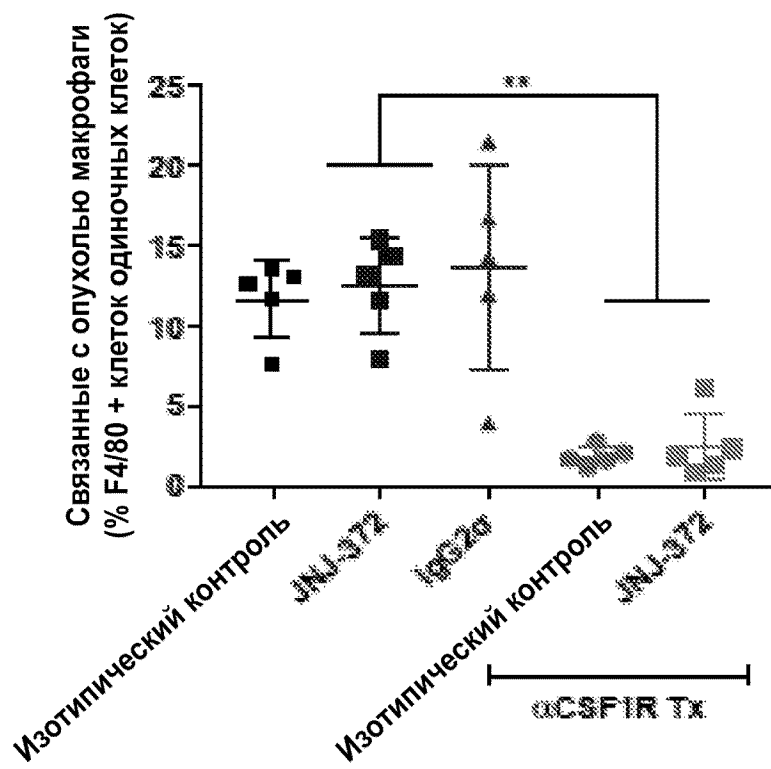
ФИГ. 32



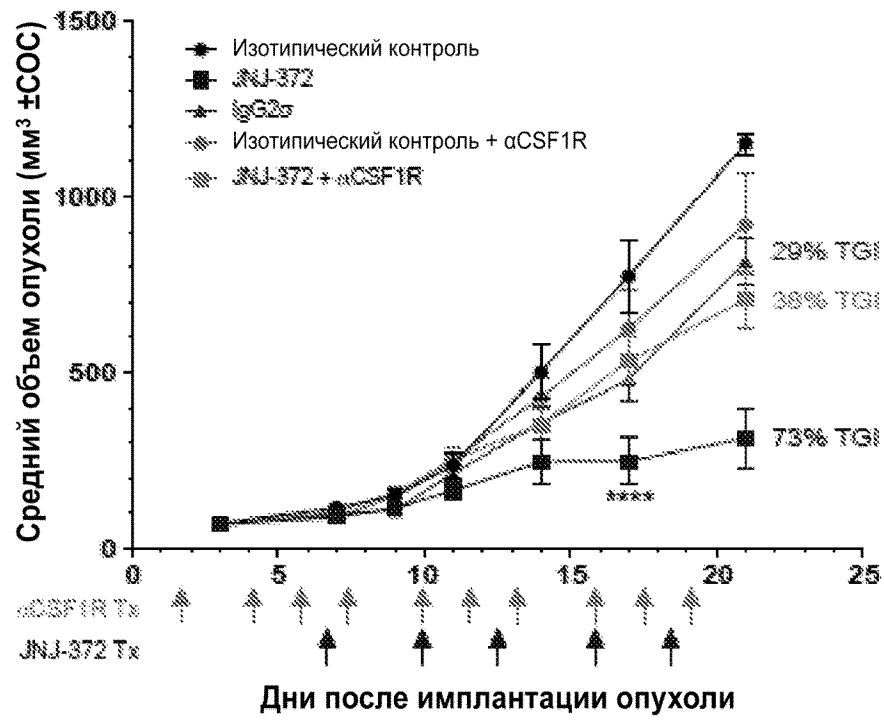
ФИГ. 33



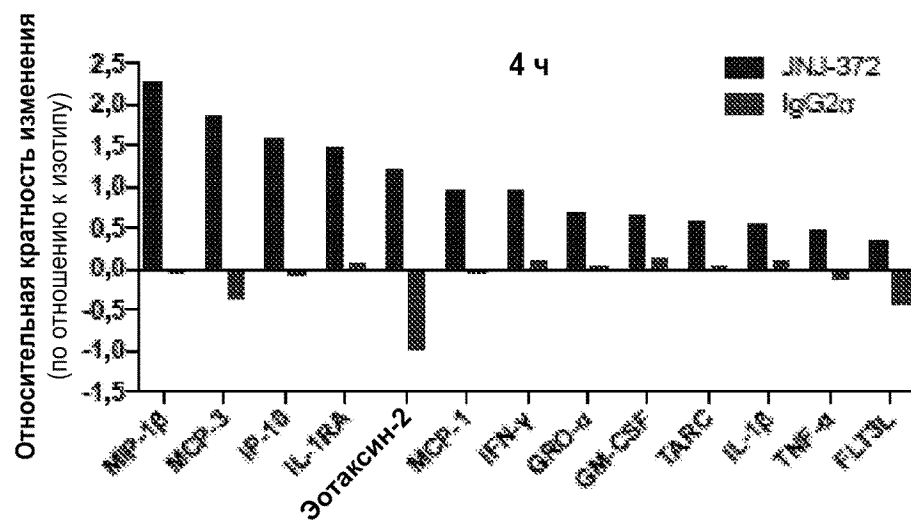
ФИГ. 34



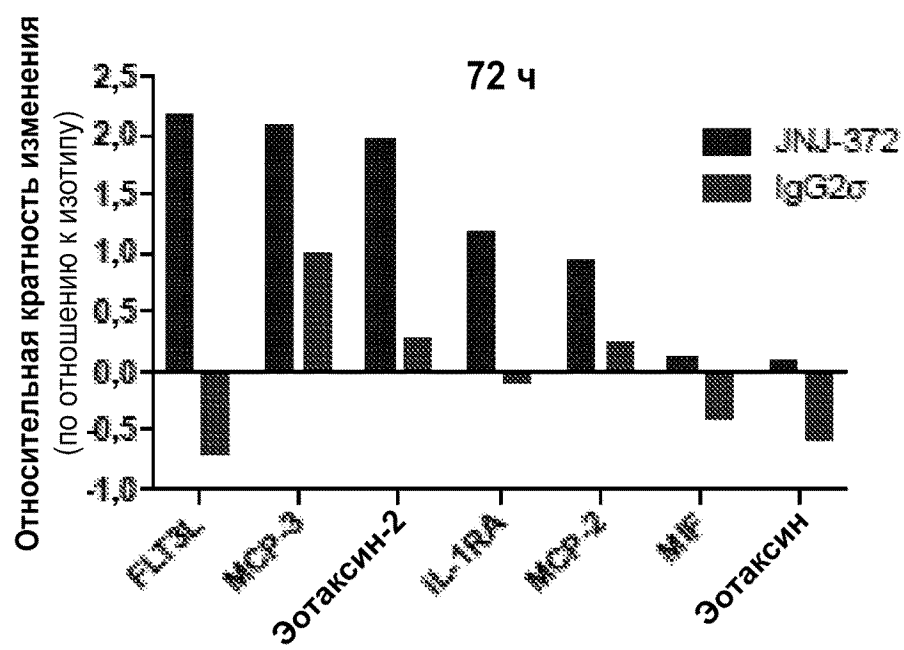
ФИГ. 35



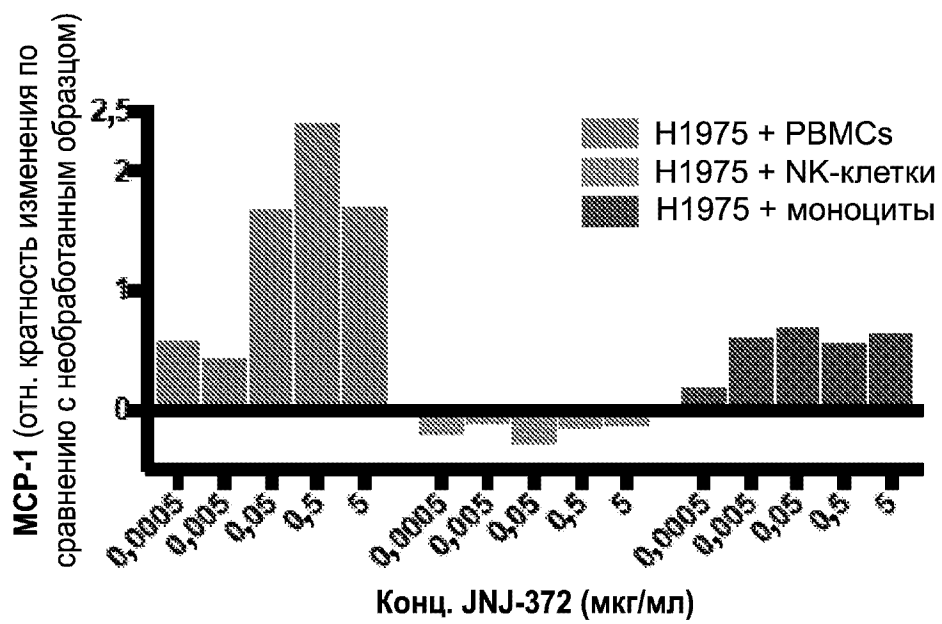
ФИГ. 36



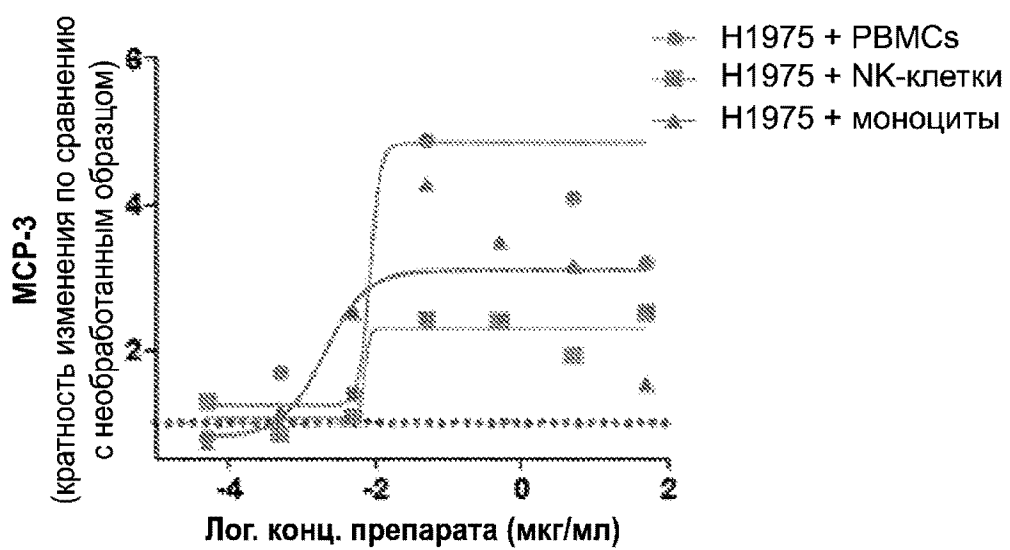
ФИГ. 37



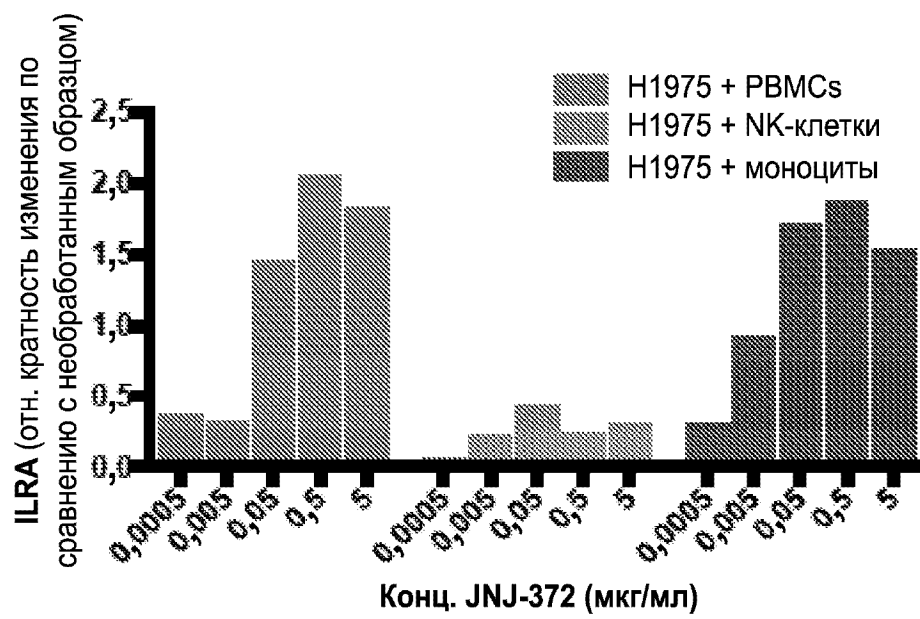
ФИГ. 38



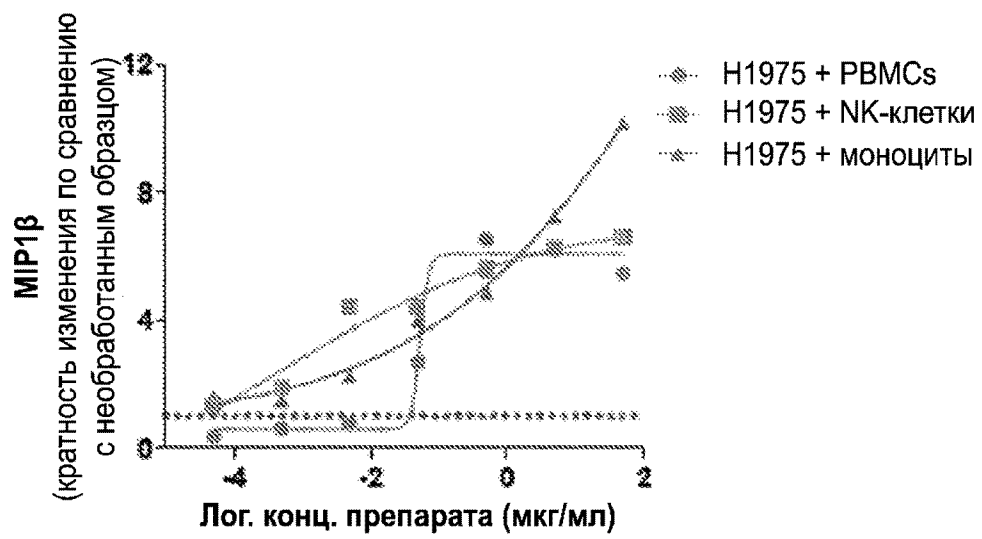
ФИГ. 39



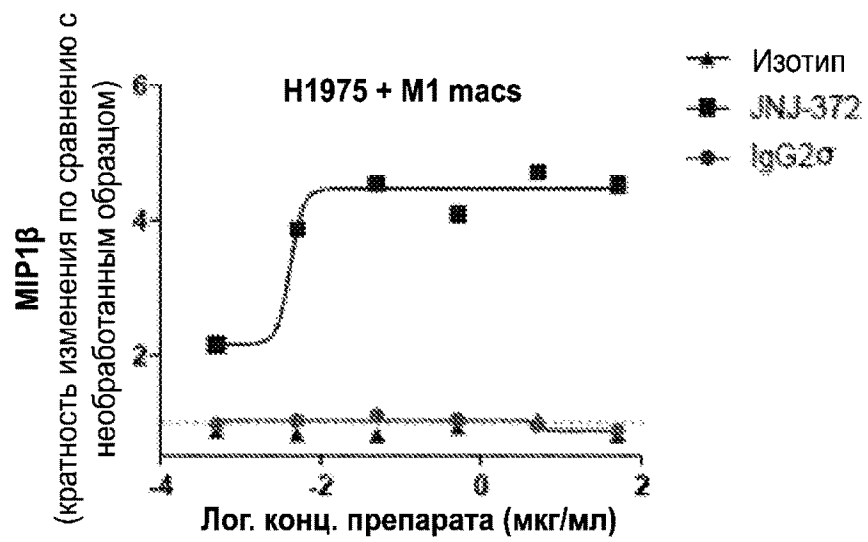
ФИГ. 40



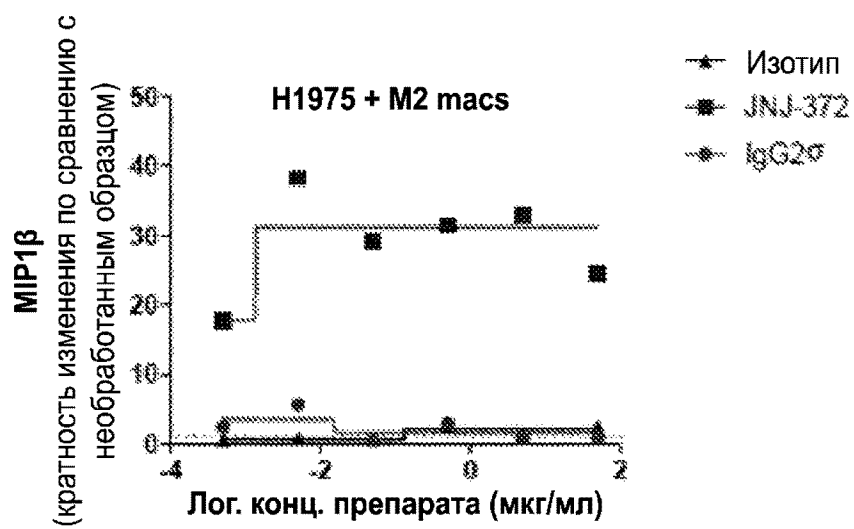
ФИГ. 41



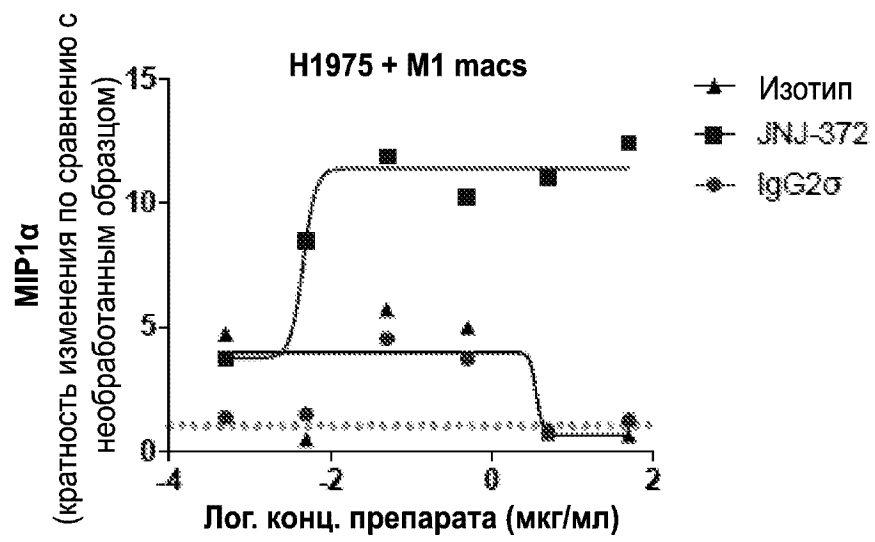
ФИГ. 42



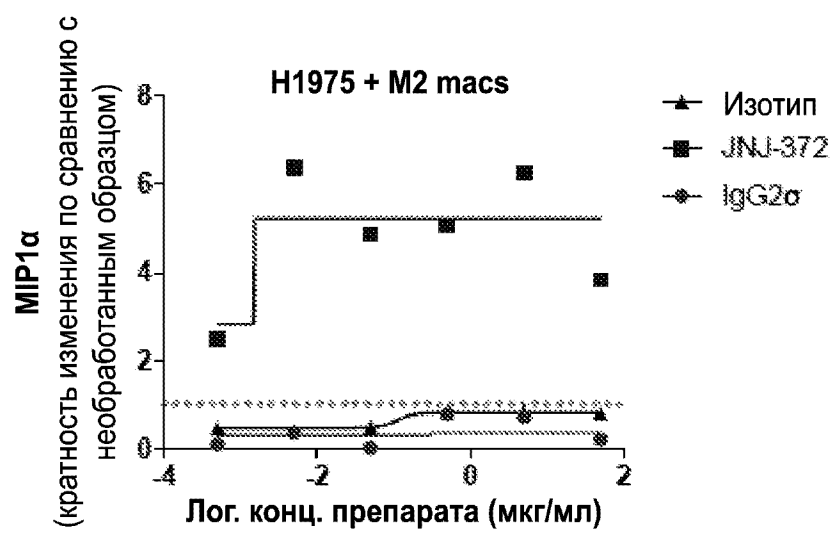
ФИГ. 43



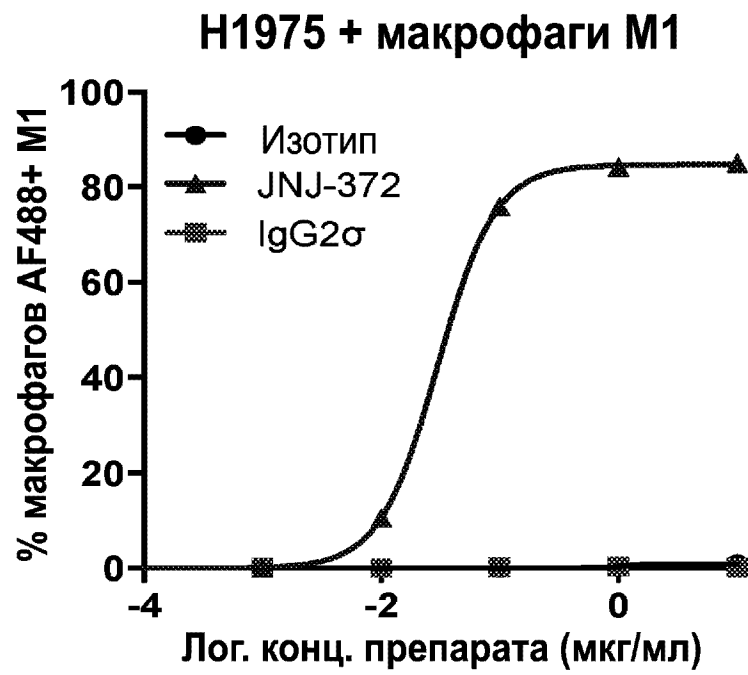
ФИГ. 44



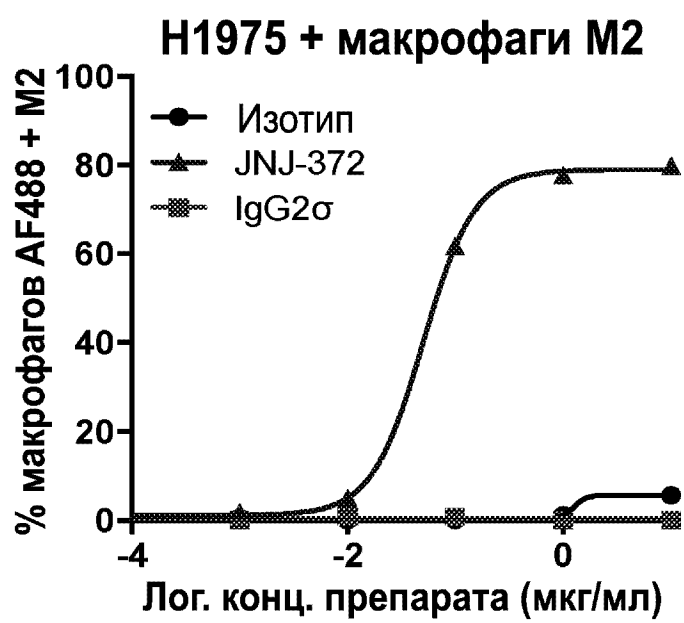
ФИГ. 45



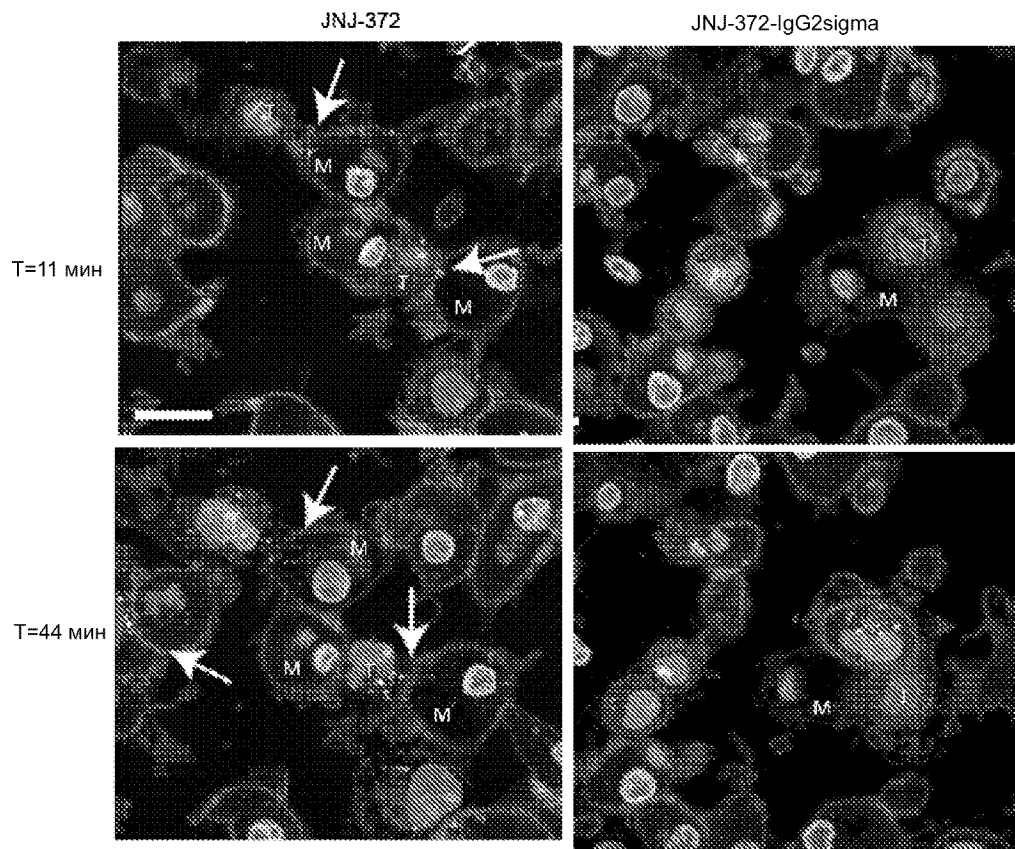
ФИГ. 46



ФИГ. 47



ФИГ. 48



ФИГ. 49

