

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191941** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.18

(22) Дата подачи заявки
2020.02.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) КОМБИНАЦИИ СВЯЗЫВАЮЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП, КОТОРЫЕ
СВЯЗЫВАЮТСЯ С EGFR, HER2 И HER3**

(31) 19157302.1; 19178564.1

(32) 2019.02.14; 2019.06.05

(33) EP

(86) PCT/NL2020/050081

(87) WO 2020/167123 2020.08.20

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Гёин Сесилия Анна Вильгельмина,
Галленн Тристан Луи Жан, Тросби
Марк, Де Крёйф Корнелис Адриан
(NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении обеспечена композиция, содержащая две или более связывающие функциональные группы, причем каждая из каждой из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3. Изобретение также относится к средствам и способу получения композиций и лечения субъектов с применением указанных композиций.

A1

202191941

202191941

A1

КОМБИНАЦИИ СВЯЗЫВАЮЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С EGFR, HER2 И HER3

Изобретение относится к области связывающихся функциональных групп, таких как антитела, в частности к области терапевтических связывающихся функциональных групп. Связывающиеся функциональные группы можно применять при лечении людей. Более конкретно, изобретение относится к композиции, содержащей две или более мультиспецифических связывающихся функциональных группы, предпочтительно мультиспецифических антител. Связывающиеся функциональные группы связываются с EGFR, HER2 и HER3. Одна клетка-хозяин может продуцировать множество связывающихся функциональных групп.

Рецептор (EGFR) эпидермального фактора роста (EGF) представляет собой прототип рецептора клеточной поверхности для членов семейства эпидермальных факторов роста (семейство EGF) внеклеточных белковых лигандов. В настоящее время семейство имеет четыре близкородственных рецепторных тирозинкиназы: EGFR, HER2 (ErbB-2/c-neu), HER3 (ErbB-3) и HER4 (ErbB-4).

EGFR присутствует на клеточной поверхности и активируется связыванием со специфическими лигандами, включая эпидермальный фактор роста и трансформирующий фактор роста α (TGF α). В результате активации своими лигандами фактора роста рецептор переходит от неактивной преимущественно мономерной формы к активному гомодимеру. Помимо формирования гомодимеров после связывания с лигандом EGFR может объединяться в пары с другим членом семейства рецепторов ErbB, таким как HER2, с образованием активированного гетеродимера. Существует также доказательство того, что димеры образуются в отсутствие связывания с лигандом, а кластеры активированных EGFR образуются после связывания с лигандом.

Димеризация EGFR стимулирует активность собственной внутриклеточной протеин-тирозинкиназы (РТК). Данная активность индуцирует несколько каскадов трансдукции сигнала, которые приводят к пролиферации и дифференцировке клеток. Киназный домен EGFR может перекрестно фосфорилировать тирозиновые остатки других рецепторов, с которыми он связан в комплекс, и сам также может быть активирован таким образом.

Мутации и сверхэкспрессия с вовлечением EGFR были выявлены при нескольких типах рака, и данный рецептор является мишенью для расширяющегося класса противораковых терапевтических средств. Они включают нацеленные на EGFR малые молекулы, такие как gefitinib и erlotinib для лечения рака легкого, а также антитела, такие как cetuximab и panitumumab для лечения рака толстой кишки и рака головы и шеи.

Хотя достигнут некоторый успех в отношении нацеленных на EGFR видов терапии, большинство из них ассоциированы с развитием резистентности к лечению со временем. Одним из способов, с помощью которого EGFR-положительные опухоли

могут избежать нацеленной терапии, является передача сигналов через другой рецепторный димер. Например, повышенная сигнализация посредством димеров EGFR/HER3, обусловленная повышенной экспрессией HER3 или херегулина, связана с устойчивостью к нацеленным на EGFR лекарственным средствам, например, при раковых заболеваниях легких и раковых заболеваниях головы и шеи. Помимо индукции резистентности к лечению наблюдали некоторые побочные эффекты нацеленных на EGFR антител. Одним из примеров является развитие кожной сыпи, связанной с ингибированием EGFR или лечением биологическими препаратами против EGFR. В крайнем случае такие сыпи могут приводить к снижению числа циклов лечения и/или преждевременному прекращению лечения.

Выявлены различные способы активации передачи сигналов посредством семейства рецепторов EGF. Среди них лиганд-зависимая и лиганд-независимая активация сигнализации. Сверхэкспрессированные HER2 способны генерировать онкогенную сигнализацию посредством гетеродимера HER2/HER3 даже при отсутствии лиганда HER3 (Junttila, Akita et al. 2009). Активность HER2 может ингибироваться HER2-специфическими антителами. Такие HER2-специфические антитела применяют, например, для лечения HER2-положительных (HER2 +) опухолей. Проблема при таких видах лечения заключается в том, что опухоли часто резистентны к HER2-специфическому лечению и продолжают расти даже в присутствии ингибирующих антител. Выявлено, что HER2-положительные опухоли, такие как опухоли молочной железы, яичника, шейки матки и желудка, могут приобретать устойчивость к лечению путем селективного разрастания субпопуляции опухолевых клеток, имеющих повышенную экспрессию HER3 (Ocana, Vera-Badillo et al. 2013) и/или экспрессию лиганда HER3 (Wilson, Fridlyand et al. 2012). Кроме того, обнаружены активирующие мутации в рецепторе HER3.

Таким образом, несмотря на многообещающие результаты лечения антителами, которые специфически воздействуют на членов семейства рецепторов EGF, обнаружено, что не все опухоли отвечают на лечение или отвечают в достаточной степени. В настоящем изобретении обеспечены комбинации связывающихся функциональных групп и способы их получения, нацеленные на различные члены семейства рецепторов EGF. Комбинации изобретения показывают хорошую эффективность. Комбинации могут быть получены экономичным и эффективным способом.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении обеспечена композиция, содержащая две или более связывающихся функциональных групп, причем каждая связывающаяся функциональная группа содержит варибельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первая из указанных связывающихся функциональных групп содержит варибельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся функциональных групп содержит варибельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3.

Предпочтительно по меньшей мере одна из двух или более связывающихся функциональных групп представляет собой антитело. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере две из двух или более связывающихся функциональных групп представляют собой антитела. Антитела предпочтительно представляют собой мультиспецифические антитела, предпочтительно биспецифические антитела. Предпочтительно по меньшей мере одно, а более предпочтительно по меньшей мере два из антител представляют собой антитела IgG. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая два биспецифических антитела.

- 5 Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно содержит тяжелые цепи с доменом гетеродимеризации CH3. В одном варианте осуществления домен гетеродимеризации CH3 первого и/или второго мультиспецифического антитела сконструирован так, чтобы облегчить гетеродимеризацию тяжелой цепи переменного домена EGFR с соответствующими тяжелыми цепями переменных доменов HER2 и HER3.

- В изобретении также обеспечена композиция, описанная в настоящем документе, для применения в лечении рака. В вариантах осуществления рак представляет собой солидный эпителиальный рак. Композицию предпочтительно используют для лечения рака, экспрессирующего EGFR, HER2 и/или HER3. Композицию предпочтительно используют для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака головы и шеи, эпителиального рака яичников, эпителиального рака фаллопиевой трубы, эпителиального рака брюшины, рака мочевого пузыря или рака предстательной железы. В вариантах осуществления рак, подвергаемый лечению с применением композиции, представляет собой распространенный рак. Композицию предпочтительно используют для лечения метастатического рака. Композицию предпочтительно используют для лечения метастатического рака поджелудочной железы, метастатического колоректального рака, метастатического рака головы и шеи, метастатического эпителиального рака яичников, метастатического эпителиального рака фаллопиевой трубы, метастатического эпителиального рака брюшины, метастатического рака мочевого пузыря или метастатического рака предстательной железы. В вариантах осуществления композицию предпочтительно используют для лечения рака, представляющего собой рак желудка, рак легкого, рак молочной железы или рак пищевода. Композицию предпочтительно используют для лечения метастатического рака желудка, метастатического рака легкого, метастатического рака молочной железы или метастатического рака пищевода.

- В изобретении дополнительно обеспечен продукт, содержащий две или более связывающихся функциональных групп, причем каждая из них содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; причем первая из указанных связывающихся функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, в качестве комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении рака.

В изобретении дополнительно предложен способ получения композиции в соответствии с изобретением, причем способ включает:

- получение клетки, содержащей
- 5 - нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен,
- 10 который связывается с внеклеточным участком HER2;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную
- 15 общую легкую цепь;
- причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией для обеспечения экспрессии кодируемых тяжелой и легкой цепей в указанной клетке, и при этом способ
- 20 дополнительно включает культивирование указанной клетки для обеспечения экспрессии указанных тяжелой и легкой цепей и необязательно сбор указанных двух или более связывающихся функциональных групп.

- Дополнительно обеспечена клетка, содержащая
- 25 - нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен,
- 30 который связывается с внеклеточным участком HER2;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную
- 35 общую легкую цепь;
- причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в указанной клетке.

40

В дополнительном аспекте изобретения обеспечен контейнер, содержащий нуклеиновую кислоту, представляющую собой

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который
- 45 связывается с внеклеточным участком EGFR;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2;

5 - нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

10 причем необязательно две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в клетке.

В изобретении дополнительно обеспечена композиция, содержащая связывающуюся функциональную группу, которая специфически связывается с 15 внеклеточным участком EGFR и внеклеточным участком HER2.

В изобретении также обеспечена композиция, содержащая связывающуюся функциональную группу, которая специфически связывается с внеклеточным участком EGFR и внеклеточным участком HER3.

20

Связывающаяся функциональная группа предпочтительно представляет собой антитело, предпочтительно антитело IgG, более предпочтительно мультиспецифическое антитело.

25 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе термин EGFR относится к белку, который у человека кодируется геном рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Белок известен под 30 множеством следующих различных наименований: Рецепторная тирозинкиназа 1 Erb-B2; протоонкогеном C-ErbB-1; ERBB1; и HER1. Учетный номер в базе данных человеческого белка EGFR и кодирующего его гена: (GenBank NM_005228.3). Учетный номер присваивают главным образом для получения дополнительного способа идентификации белка EGFR в качестве мишени, причем фактическая последовательность белка EGFR, связанного с антителом, может изменяться, например, в результате мутации в 35 кодирующем гене, например, возникающей при некоторых раковых заболеваниях или т. п. При упоминании в настоящем документе EGFR подразумевается человеческий EGFR, если не указано иное. В связи со сходством последовательности и третичной структуры между ортологами EGFR человека и млекопитающего вариабельный домен EGFR может также связываться с таким ортологом, но не обязательно. Вариабельный 40 домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR и множеством его вариантов, таких как экспрессируемые на некоторых EGFR-положительных опухолях.

Связывающийся с EGFR вариабельный домен антитела или связывающаяся функциональная группа изобретения предпочтительно связывается с доменом I или 45 доменом III EGFR. Структура белка EGFR описана, помимо прочего, в публикации

Ferguson (2008; Annu Rev Biophys. 2008; 37: 353–373.

doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829). Домены человеческого EGFR описаны на Фиг. 1 вышеупомянутой ссылки на публикацию автора Ferguson. Связывающийся с EGFR вариабельный домен вариантов осуществления изобретений, описанных в настоящем документе, предпочтительно связывается с доменом III EGFR. Антитело предпочтительно ингибирует индуцированную EGF пролиферацию клеток ВхРС-3 (ATCC CRL-1687) или ВхРС-3-luc2 (Perkin Elmer 125058).

В настоящем документе термин HER2 относится к белку, который у человека кодируется геном ERBB-2. К альтернативным названиям для гена или белка относятся CD340; ErbB-2; HER-2/neu; MLN 19; NEU; NGL; TKR1. Ген ERBB-2 часто называют HER2 (от «рецептор 2 эпидермального фактора роста человека»). При упоминании в настоящем документе HER2 подразумевается человеческий HER2. Антитело, содержащее вариабельный домен, который связывается с HER2, связывается с человеческим HER2. В связи со сходством последовательности и третичной структуры между ортологами HER2 человека и млекопитающего вариабельный домен HER2 может также связываться с таким ортологом, но не обязательно. Учетные номера в базе данных человеческого белка HER2 и кодирующего его гена: (NP_001005862.1, NP_004439.2, NC_000017.10, NT_010783.15). Учетные номера присвоены главным образом для получения дополнительного способа идентификации HER2 в качестве мишени, причем фактическая последовательность белка HER2, связанного с антителом, может изменяться, например, в результате мутации в кодирующем гене, например, возникающей при некоторых раковых заболеваниях или т. п. Вариабельный домен HER2 может связываться с HER2 и различными его вариантами, такими как экспрессируемые некоторыми HER2-положительными опухолевыми клетками.

Белок HER2 содержит несколько доменов (см. Фиг. 1 в публикации Landgraf, R Breast Cancer Res. 2007; 9(1): 202-). Внеклеточные домены называют доменами I–IV. Вариабельный домен вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, который связывается с HER2, предпочтительно связывается с доменом I или доменом IV HER2, предпочтительно доменом IV.

В настоящем документе термин HER3 относится к белку, который у человека кодируется геном ERBB3. К альтернативным названиям для гена или белка относятся LCCS2; MDA-BF-1; c-ErbB-3; c-ErbB3; ErbB3-S; p180-ErbB3; p45-sErbB3; и p85-sErbB3. При упоминании в настоящем документе HER3 подразумевается человеческий HER3. Антитело, содержащее вариабельный домен, связывающийся с HER3, связывается с человеческим HER3. В связи со сходством последовательности и третичной структуры между ортологами HER3 человека и млекопитающего вариабельный домен HER3 может также связываться с таким ортологом, но не обязательно. Учетные номера в базе данных человеческого белка HER3 и кодирующего его гена: (NP_001005915.1; NP_001973.2, NC_000012.11, NT_029419.12). Учетные номера присвоены главным образом для получения дополнительного способа идентификации HER3 в качестве мишени, причем фактическая последовательность белка HER3, связанного с антителом, может изменяться, например, в результате мутации в кодирующем гене, например, возникающей при

некоторых раковых заболеваниях или т. п. Вариабельный домен HER3 может связываться с HER3 и различными его вариантами, такими как экспрессируемые некоторыми HER2-положительными опухолевыми клетками.

5 Структура HER3, среди прочих, описана в публикации Cho et al (2002; Science 297, 1330–1333; DOI: 10.1126/science.1074611). Человеческий белок имеет четыре
внеклеточных домена. Вариабельный домен вариантов осуществления описанных в
настоящем документе изобретений, который связывается с HER3, предпочтительно
10 связывается с доменом III HER3. В предпочтительном варианте осуществления
аффинность (KD) вариабельного домена к HER3-положительной клетке равна 2,0 нМ или
менее, более предпочтительно равна 1,5 нМ или менее, более предпочтительно равна
1,39 нМ или менее, более предпочтительно равна 0,99 нМ или менее. В
предпочтительном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением
предпочтительно содержит вариабельный домен, который связывается с по меньшей
15 мере одной аминокислотой домена III HER3, выбранной из группы, содержащей R426 и
аминокислотные остатки, которые расположены в пределах 11,2 Å от R426 в нативном
белке HER3. В одном предпочтительном варианте осуществления аффинность (KD)
вариабельного домена к HER3 на клетках SK-BR-3 равна 2,0 нМ или менее, более
предпочтительно равна 1,5 нМ или менее, более предпочтительно равна 1,39 нМ или
20 менее, предпочтительно равна 0,99 нМ или менее. В одном варианте осуществления
указанная аффинность (KD) находится в диапазоне 1,39–0,59 нМ. В одном
предпочтительном варианте осуществления аффинность (KD) вариабельного домена к
HER3 на клетках BT-474 равна 2,0 нМ или менее, более предпочтительно равна 1,5 нМ
или менее, более предпочтительно равна 1,0 нМ или менее, более предпочтительно
25 меньше 0,5 нМ, более предпочтительно равна 0,31 нМ или менее, более предпочтительно
равна 0,23 нМ или менее. В одном варианте осуществления указанная аффинность (KD)
находится в диапазоне 0,31–0,15 нМ. Вышеупомянутые аффинности предпочтительно
измеряют с помощью измерений аффинности к клеткам в равновесном состоянии,
причем клетки инкубируют при 4 °C с использованием радиоактивно меченного
30 антитела, после чего измеряют связанную с клетками радиоактивность.

Вариабельный домен, который связывается с по меньшей мере одной
аминокислотой домена III HER3, предпочтительно связывается с аминокислотой,
выбранной из группы, содержащей R426 и аминокислотные остатки, расположенные в
35 пределах 11,2 Å от R426 нативного белка HER3. Предпочтительно указанные
аминокислотные остатки, расположенные в пределах 11,2 Å от R426 нативного белка
HER3, выбраны из группы, состоящей из L423, Y424, N425, G427, G452, R453, Y455,
E480, R481, L482, D483 и K485 (см., например, Фиг. 9 и таблицу 1). Нумерация
аминокислотных остатков соответствует нумерации базы данных белков (PDB) № 4P59.
40 Антитела, связывающиеся с этой областью домена III HER3, имеют особенно хорошие
характеристики связывания и способны противодействовать активности HER3 на HER3-
положительных клетках. Вариабельные домены с характеристиками связывания с HER3
описаны в WO2015/130172, включенной в настоящий документ путем ссылки. В одном
предпочтительном варианте осуществления обеспечено биспецифическое антитело в
45 соответствии с изобретением, которое содержит вариабельный домен, который

связывается с по меньшей мере R426 домена III HER3. Указанное антитело предпочтительно содержит переменный домен, который связывается с по меньшей мере R426 домена III HER3.

5

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит два или более антител, причем каждое из указанных антител содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первое из указанных антител содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а
 10 второе из указанных антител содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3. В предпочтительном варианте осуществления переменные домены, которые связываются с внеклеточным участком EGFR первого и второго антител, имеют по существу одинаковую аминокислотную последовательность. В одном варианте осуществления указанные первое и второе антитела содержат
 15 переменный домен, который связывается с доменом I EGFR, и указанное первое антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом I HER2, и указанное второе антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом III HER3. В другом варианте осуществления указанные первое и второе антитела содержат переменный домен, который связывается с доменом I EGFR, и
 20 указанное первое антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом IV HER2, и указанное второе антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом III HER3. В дополнительном варианте осуществления указанные первое и второе антитела содержат переменный домен, который связывается с доменом III EGFR, и указанное первое антитело содержит переменный домен, который
 25 связывается с доменом I HER2, и указанное второе антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом III HER3. В дополнительном варианте осуществления указанные первое и второе антитела содержат переменный домен, который связывается с доменом III EGFR, и указанное первое антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом IV HER2, и указанное второе
 30 антитело содержит переменный домен, который связывается с доменом III HER3.

В некоторых вариантах осуществления связывающаяся функциональная группа представляет собой белок или аптамер. Связывающаяся функциональная группа, как описано в настоящем документе, как правило, имеет две или более специфичностей
 35 связывания. Связывающаяся функциональная группа предпочтительно содержит два или более переменных домена антител. Переменные домены могут быть обеспечены различными способами. Ряд фрагментов, содержащих переменный домен антитела, описан в публикации «Nelson 2010: MAb. 2010 Jan-Feb;2(1):77–83», и они включают различные Fv-фрагменты, scFv-фрагменты и так называемые однодоменные антитела,
 40 такие как VHH-фрагменты. В настоящее время хорошо известны различные Fv-фрагменты или одноцепочечные Fv-фрагменты. Однодоменное антитело представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. Как и антитело целиком, он способен избирательно связываться с конкретным антигеном. При молекулярной массе всего 12–15 кДа однодоменные антитела гораздо
 45 меньше обычных антител (150–160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых

цепей и двух легких цепей, и даже меньше Fab-фрагментов (~ 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечных переменных фрагментов (~ 25 кДа, два переменных домена, один от легкой и один от тяжелой цепи). Однодоменные фрагменты сначала получали из антител с тяжелой цепью верблюда. В настоящее время
 5 аналогичные однодоменные фрагменты могут быть созданы искусственно и получены из других организмов. Переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Переменные домены иногда также называют комбинациями VH/VL, где VH означает переменную область тяжелой цепи, а VL переменную область легкой цепи.

10

Две или более функциональных групп могут быть связаны для создания связывающихся функциональных групп с соответствующим числом специфичностей связывания. Связывание, как правило, происходит со связывающим пептидом, содержащим 2 или более аминокислотных остатков. Линкерные функциональные группы
 15 могут также являться частью белка или представлять собой весь белок. Например, иногда используют человеческий сывороточный альбумин. Связывающиеся функциональные группы, описанные в настоящем документе, предпочтительно содержат по меньшей мере один переменный домен с переменной областью тяжелой цепи MF, например, как описано на Фиг. 7 или Фиг. 8, объединенный в пару с переменной областью легкой
 20 цепи, например переменной областью легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления связывающаяся функциональная группа содержит два или более таких переменных доменов.

20

Связывающаяся функциональная группа, которая связывается с EGFR и HER2, представляет собой связывающуюся функциональную группу, отличную от
 25 связывающейся функциональной группы, которая связывается с EGFR и HER3. В случае если по меньшей мере одна из связывающихся функциональных групп представляет собой мультиспецифическое антитело, по меньшей мере одно мультиспецифическое антитело может связываться с по меньшей мере EGFR и HER2 или связываться с по
 30 меньшей мере EGFR и HER3. В предпочтительном варианте осуществления связывающиеся функциональные группы содержат биспецифические антитела, причем одно биспецифическое антитело связывается с EGFR и HER2, а другое биспецифическое антитело связывается с EGFR и HER3.

30

В настоящем документе термин «антитело» означает белковую молекулу, относящуюся к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более доменов, которые связываются с эпитопом на антигене, причем такие домены получены из
 35 переменной области антитела или имеют общую с ним гомологию последовательности. Как правило, антитела состоят из базовых структурных единиц, каждая из которых имеет две тяжелые цепи и две легкие цепи. Антитела для терапевтического применения
 40 предпочтительно имеют максимально возможное сходство с естественными антителами подлежащего лечению субъекта (например, с человеческими антителами, если субъекты являются людьми). Антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным форматом или способом получения.

45

Поскольку антитело, как правило, распознает эпитоп антигена, такой эпитоп может присутствовать и в других соединениях, антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые «специфически распознают» антиген, например EGFR, HER2 или HER3, могут также распознавать другие соединения, если такие другие соединения содержат эпитоп аналогичного типа. Таким образом, термины «специфически распознает» или «специфически связывается» или термины с таким же значением в отношении взаимодействия антигена и антитела не исключают связывания антител с другими соединениями, которые содержат аналогичный эпитоп или эпитоп аналогичного типа.

10

«Биспецифическое антитело» представляет собой антитело, описанное в настоящем документе, в котором один переменный домен антитела связывается с первым антигеном, а второй переменный домен антитела связывается со вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены не являются идентичными. Термин «биспецифическое антитело» также охватывает антитела, в которых одна комбинация переменной области тяжелой цепи / переменной области легкой цепи (VH/VL) связывается с первым эпитопом на антигене, а вторая комбинация VH/VL связывается со вторым эпитопом. Второй эпитоп может представлять собой другой эпитоп на том же антигене. Термин дополнительно включает антитела, в которых VH способна специфически распознавать первый антиген, а VL, объединенная в пару с VH в переменной области иммуноглобулина, способна специфически распознавать второй антиген. Полученная пара VH/VL будет связываться с антигеном 1 или антигеном 2. Такие так называемые «антитела два в одном» описаны, например, в WO 2008/027236, WO 2010/108127 и публикации Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472–486, October 2011). Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения.

Биспецифическое антитело представляет собой пример мультиспецифического антитела. Три- и более специфическое антитело можно получать путем добавления связывающейся функциональной группы, такой как scFv-фрагмент, к одной или более тяжелым цепям. Можно также добавлять один или более переменных доменов к переменной области нормального или биспецифического антитела. Клетка, которая продуцирует общую легкую цепь и две различные тяжелые цепи, каждая из которых может образовывать функциональный переменный домен с общей легкой цепью, продуцирует, среди прочего, биспецифическое антитело с двумя различными комбинациями тяжелой и легкой цепей. Аналогичным образом клетка, продуцирующая общую легкую цепь и три или более разных тяжелых цепей, может образовывать несколько биспецифических антител, которые вместе способны направленно воздействовать на три или более антигенов. В настоящее время возможно построение на стандартном формате антител (т. е. константный участок и два переменных домена) и добавление дополнительных связывающих доменов. Таким образом, можно получать мультиспецифические антитела, у которых имеются один или более одноцепочечных Fv с дополнительными специфичностями связывания, присоединенные к константному или одному или более переменных доменов антитела. Можно также получать тяжелые цепи с двумя или более переменными областями. Дополнительные области тяжелой цепи

могут быть преимущественно связаны с различными или общими вариабельными областями легкой цепи. Пример описания таких антител приведен по US 62/650467, который включен в настоящий документ путем ссылки.

- 5 Термин «процент (%) идентичности», используемый в настоящем документе в отношении нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей, определяется как процентная доля остатков в потенциальной последовательности, идентичных остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей для оптимального сравнения. Процент идентичности
- 10 последовательностей для сравнения нуклеотидных последовательностей определяют с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 10.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействованы модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994) Nuc. Acids Res. 22: 4673–4680), матрица вкладов swgapdnarnt, штраф за внесение
- 15 гэпа равен 15, и штраф за удлинение гэпа равен 6,66. Аминокислотные последовательности выравнивают с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействован модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., 1994), матрица вкладов blosum62mt2, штраф за внесение
- 20 гэпа равен 10, а штраф за удлинение гэпа равен 0,1.

- При использовании в настоящем документе термин «общая легкая цепь» относится к легким цепям, таким как те, которые можно использовать в
- 25 мультиспецифическом антителе. В биспецифических антителах две легкие цепи могут представлять собой общую легкую цепь (или ее участок VL). Две легкие цепи (или VL участки) могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, не приводящие к изменению специфичности связывания полноразмерного антитела. Термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одиночная легкая цепь», «одиночная VL» с добавлением или без добавления термина
- 30 «перестроенная» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Термин «общий» относится к легким цепям, которые имеют одинаковую последовательность, а также к функциональным эквивалентам, аминокислотная последовательность которых не является идентичной. Существуют множество вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, вставки и/или добавления), которые не
- 35 влияют на формирование функциональных связывающих областей. Легкая цепь настоящего изобретения может также представлять собой легкую цепь, как указано в настоящем документе, имеющую от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию. Например, оставаясь в рамках объема определения общих легких цепей, используемого в настоящем документе,
- 40 получают или обнаруживают легкие цепи, которые не являются идентичными, но сохраняют функциональную эквивалентность, например, посредством внедрения и исследования консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не влияют или лишь частично влияют на специфичность связывания при объединении в пару с тяжелой цепью, и т. п. В некоторых вариантах осуществления
- 45 мультиспецифические антитела с тремя или более вариабельными доменами имеют

вариабельные домены с разными тяжелыми цепями и одинаковой легкой цепью или легкой цепью с некоторыми аминокислотными различиями, в то время как на специфичность связывания полноразмерного мультиспецифического антитела не

5 легкую цепь, как описано в настоящем документе. В предпочтительном варианте осуществления все вариабельные домены мультиспецифического антитела содержат общую легкую цепь. Общая легкая цепь (вариабельная область) для применения в поливалентных антителах изобретения может представлять собой легкую цепь лямбда, поэтому она также предусмотрена в контексте изобретения, однако предпочтительной

10 является легкая цепь каппа. Общая легкая цепь изобретения может содержать константную область легкой цепи каппа или лямбда. Она предпочтительно представляет собой константную область легкой цепи каппа, причем предпочтительно указанная общая легкая цепь представляет собой легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии, содержащую

15 генный сегмент IgVK1-39, например перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии IgVK1-39*01/IGJK1*01. Примеры аминокислотных последовательностей общей легкой цепи показаны на Фиг. 7 (последовательность 10, 11 или 12).

Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с

20 изобретением означает содержание по существу полного IgG, при этом оно не обязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание сомнений следует уточнить, что полноразмерный IgG содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константную (C) и вариабельную (V) области, которые могут быть разделены на домены, обозначаемые CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Антитело IgG

25 связывается с антигеном посредством доменов вариабельной области, содержащихся в Fab-участке, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы через константные домены, в основном через Fc-участок. Полноразмерные антитела в соответствии с изобретением охватывают молекулы IgG, в которых могут присутствовать мутации, обеспечивающие требуемые характеристики.

30 Полноразмерные IgG не должны иметь делеций или существенных участков любой из областей. Однако молекулы IgG, в которых удален один или несколько аминокислотных остатков, без существенного изменения характеристик связывания полученной молекулы IgG охватываются термином «полноразмерные IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно в областях,

35 отличных от CDR, причем удаленные аминокислоты не являются обязательными для специфичности связывания антигена или эпитопа IgG. Примерами антител IgG являются антитела IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения IgG представляет собой IgG1.

40 Предпочтительно по меньшей мере одна из двух или более связывающихся функциональных групп представляет собой антитело. Антитело может содержать вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельный домен, который связывается с

внечелочным участком EGFR, и вариабельный домен, который связывается с внечелочным участком HER3.

Две или более связывающихся функциональных групп предпочтительно содержат два или более антител, предпочтительно мультиспецифических антител, каждое из которых содержит вариабельный домен, который связывается с внечелочным участком EGFR; и при этом первое из указанных антител содержит вариабельный домен, который связывается с внечелочным участком HER2, а второе из указанных антител содержит вариабельный домен, который связывается с внечелочным участком HER3. Предпочтительным примером композиции, содержащей два или более мультиспецифических антитела, является композиция, содержащая два или более биспецифических антитела. Не имеющий ограничительного характера пример композиции, содержащей два биспецифических антитела, описанных в настоящем документе, схематично показан на Фиг. 1. Показаны два биспецифических антитела, каждое из которых имеет две тяжелые цепи (1) и две легкие цепи (4). Два антитела имеют общую тяжелую цепь с вариабельной областью (5) тяжелой цепи. Они отличаются по вариабельной области другой тяжелой цепи. Одно антитело имеет вариабельную область (6) тяжелой цепи. Другое антитело имеет вариабельную область (7) тяжелой цепи. Все вариабельные области тяжелой цепи могут объединяться в пару с общей легкой цепью (4) с образованием функциональных связывающихся доменов. При продуцировании той же клеткой тяжелые цепи направляются на гетеродимеризацию при наличии домена (2, 3) гетеродимеризации. Домен гетеродимеризации имеет две части: одну часть на одной тяжелой цепи и совместимую часть на другой тяжелой цепи. Домен гетеродимеризации часто находится в области CH3 IgG1. Гетеродимеризация может быть направлена путем обеспечения выбранных тяжелых цепей соответствующей частью.

В настоящем изобретении выбранное образование биспецифических антител к EGFRxHER2 и EGFRxHER3 может быть направлено путем встраивания одной части (3) домена гетеродимеризации в тяжелую цепь, которая образует вариабельный домен к EGFR, и совместимой части (2) в тяжелые цепи, которые образуют связывающиеся с HER2 и HER3 домены.

Тяжелая цепь, которая имеет вариабельную область тяжелой цепи, которая вместе с легкой цепью образует вариабельный домен, который связывается с антигеном, таким как EGFR, HER2 или HER3, в настоящем документе также называется тяжелой цепью EGFR или тяжелой цепью HER2 и т. д. В предпочтительном варианте осуществления изобретения области CH3 тяжелых цепей первого и/или второго антитела сконструированы с возможностью облегчения гетеродимеризации тяжелой цепи EGFR с тяжелой цепью HER2 и тяжелой цепи EGFR с тяжелой цепью HER3. В предпочтительном варианте осуществления для конструирования с обеспечением упрощения гетеродимеризации используют положения остатков DEKK, ранее описанные в патентах США № 9,248,182; 9,358,286; 9,248,182; и 9,758,805.

В некоторых вариантах осуществления связывание антител композиции с EGFR блокирует связывание EGF с EGFR, и/или при этом связывание антител композиции с HER3 блокирует связывание нейрегулина 1 (NRG) с HER3. В предпочтительном варианте

осуществления связывание антител композиции с EGFR блокирует связывание EGF с EGFR, а связывание антител композиции с HER3 блокирует связывание нейрегулина 1 (NRG) с HER3

- 5 Вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.
- 10 Вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 SYGMH, последовательность CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG и последовательность CDR3 DYRRTARAGFDY, или их
- 15 вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.
- Вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 SYGMH, последовательность CDR2
- 20 WINPNSGGTNYAQKFQG и последовательность CDR3 DHGSRHFWSYWGFY, или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.
- В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит два биспецифических антитела, причем первое из указанных биспецифических антител
- 25 содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR. В предпочтительном варианте
- 30 осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3
- 35 аминокислот в CDR.
- В предпочтительном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2
- 40 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR, и при этом указанное первое биспецифическое антитело дополнительно содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, причем вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую
- 45 последовательность CDR1 SYGMH, последовательность CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG

- и последовательность CDR3 DYYRRTARAGFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот в CDR, и при этом указанное второе биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, причем переменный домен
- 5 предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 GYMH, последовательность CDR2 WINPNSGGTNYAQKFQG и последовательность CDR3 DHGSRHFWSYWGFY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.
- 10 В предпочтительном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант,
- 15 содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR, и при этом указанное первое биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, причем переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 SYGMH, последовательность CDR2 VISYDGSNKYADSVKG
- 20 и последовательность CDR3 GDYGSYSSYAFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот в CDR, и при этом указанное второе биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, причем переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую
- 25 последовательность CDR1 GYMH, последовательность CDR2 WINPNSGGTNYAQKFQG и последовательность CDR3 DHGSRHFWSYWGFY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

- Допускаются консервативные вариации 1, 2 или 3 аминокислотных остатков
- 30 описанных последовательностей CDR с сохранением того же типа активности связывания (в отношении типа, но необязательно величины). Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи предпочтительно содержат последовательности, которые отличаются от описанных последовательностей CDR не более чем на три, предпочтительно не более чем на две, более предпочтительно не более
- 35 чем на одну аминокислоту. В определенных вариантах осуществления последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи идентичны описанным последовательностям CDR.

- В некоторых вариантах осуществления переменный домен к EGFR содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3
- 40 области VH к EGFR, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8. Предпочтительно MF3755, изображенный на Фиг. 7 или Фиг. 8.

- В некоторых вариантах осуществления переменный домен к EGFR содержит переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную
- 45 последовательность, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на

95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности области VH к EGFR, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8. Предпочтительно MF3755, изображенный на Фиг. 7 или Фиг. 8.

5

Например, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи биспецифического антитела, которая связывается с человеческим EGFR, может иметь 0–10, предпочтительно 0–5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений в последовательности переменной области тяжелой цепи за пределами трех последовательностей CDR или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию.

15

В определенных вариантах осуществления переменный домен к EGFR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из области VH к EGFR, выбранную из Фиг. 7 или Фиг. 8. Предпочтительно MF3755, изображенный на Фиг. 7 или Фиг. 8.

20

В некоторых вариантах осуществления переменный домен к HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области VH к HER2, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8, предпочтительно MF2032, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8.

25

В некоторых вариантах осуществления переменный домен к HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичную или на 100% идентичную аминокислотной последовательности области VH к HER2, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8, предпочтительно MF2032, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8.

30

Например, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи биспецифического антитела, которая связывается с человеческим HER2, может иметь 0–10, предпочтительно 0–5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений в последовательности переменной области тяжелой цепи за пределами трех последовательностей CDR или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию.

35

40

В определенных вариантах осуществления переменный домен к HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

45

выбранную из MF1849 или MF2032, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8;
предпочтительно MF2032, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8.

5 В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен к HER3 содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области VH MF3178, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 8.

10 В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен к HER3 содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в MF3178, изображенной на Фиг. 7 или Фиг. 8.

15 Например, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи биспецифического антитела, которая связывается с человеческим HER3, может иметь 0–10, предпочтительно 0–5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений в последовательности вариабельной области тяжелой цепи за пределами трех последовательностей CDR или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию.

25 В определенных вариантах осуществления вариабельный домен HER3 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF3178, представленную на Фиг. 7 или Фиг. 8.

30 В предпочтительном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из области VH к EGFR, выбранной из Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее варианта, предпочтительно MF3755, изображенную на Фиг. 7
35 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное первое биспецифическое антитело дополнительно содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, причем вариабельный домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную
40 последовательность, выбранную из MF1849 или MF2032, изображенной на Фиг. 7 или Фиг. 8, или их варианта; предпочтительно MF2032, показанной на Фиг. 7 или Фиг. 8, или их варианта, причем указанный вариант содержит замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное второе биспецифическое антитело дополнительно содержит вариабельный домен,
45 который связывается с внеклеточным участком HER3, причем вариабельный домен

содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF3178, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

5

В предпочтительном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF3755, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное первое биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, причем переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF2032, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное второе биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, причем переменный домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF3178, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

В одном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF4280, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное первое биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF1849, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR; и при этом указанное второе биспецифическое антитело дополнительно содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF3178, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

В одном варианте осуществления первое и второе из указанных биспецифических антител содержат переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF4280, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант,

45

показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку из 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

Примеры переменных областей тяжелой цепи к EGFR описаны в WO2015/130172 и PCT/NL2018/050537, включенных в настоящий документ путем ссылки. Примеры переменных областей тяжелой цепи к HER2 описаны в WO2015/130173, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Примеры переменных областей тяжелой цепи к HER3 описаны в WO2015/130172; и WO2015/130173, которые включены в настоящий документ путем ссылки.

10

Дополнительные варианты описанных аминокислотных последовательностей, которые сохраняют способность связывания с EGFR, HER2 или HER3, можно получать, например, из библиотек фаговых дисплеев, которые содержат перестроенную человеческую область IGKV1-39/IGKJ1 VL (De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 15 2010 (106)741–50) и набор областей VH, содержащих аминокислотные замены в аминокислотной последовательности области VH к EGFR, HER2 или HER3, как описано ранее в настоящем документе. Фаги, кодирующие Fab-участки, которые связываются с EGFR, HER2 или HER3, могут быть выбраны и проанализированы с помощью проточной цитометрии и секвенированы для идентификации вариантов с аминокислотными 20 заменами, вставками, делециями или добавлениями, которые сохраняют способность связывания с антигеном.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная группа, которая специфически связывается с внеклеточным участком EGFR и 25 внеклеточным участком HER2. Связывающаяся функциональная группа предпочтительно содержит переменный домен, который связывается с EGFR, и переменный домен, который связывается с HER2. Переменный домен, связывающийся с EGFR, предпочтительно представляет собой переменный домен к EGFR, описанный в настоящем документе. Переменный домен, который связывается с 30 HER2, предпочтительно представляет собой переменный домен к HER2, описанный в настоящем документе. Предпочтительно переменные домены к EGFR и HER2 представляют собой переменные домены, описанные в настоящем документе.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная 35 группа, которая специфически связывается с внеклеточным участком EGFR и внеклеточным участком HER3. Связывающаяся функциональная группа предпочтительно содержит переменный домен, который связывается с EGFR, и переменный домен, который связывается с HER3. Переменный домен, связывающийся с EGFR, предпочтительно представляет собой переменный домен к 40 EGFR, описанный в настоящем документе. Переменный домен, который связывается с HER3, предпочтительно представляет собой переменный домен к HER3, описанный в настоящем документе. Предпочтительно переменные домены к EGFR и HER3 представляют собой переменные домены, описанные в настоящем документе.

В изобретении дополнительно обеспечена композиция, содержащая связывающуюся функциональную группу, которая специфически связывается с внеклеточным участком EGFR и внеклеточным участком HER2, и связывающаяся функциональная группа, которая специфически связывается с внеклеточным участком EGFR и внеклеточным участком HER3.

Связывающаяся функциональная группа, описанная в настоящем документе, предпочтительно представляет собой антитело, предпочтительно мультиспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело.

Вариабельные области легкой цепи (VL) переменного домена к EGFR, переменного домена к HER2 и переменного домена к HER3 связывающихся функциональных групп, таких как биспецифические антитела, могут быть идентичными области VL исходного моноспецифического антитела к EGFR; области VL исходного моноспецифического антитела к HER2 и/или идентичными исходному моноспецифическому антителу к HER3. Альтернативные области VL можно применять для одной или более комбинаций областей VH/VL при условии, что переменные домены сохраняют связывание соответственно с EGFR, HER2 или HER3.

В некоторых вариантах осуществления область VL переменного домена к EGFR, переменного домена к HER2 и переменного домена к HER3 аналогичны. В определенных вариантах осуществления области VL во всех переменных доменах связывающихся функциональных групп идентичны.

В определенных вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного, двух, трех или более переменных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит общую переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменная область общей легкой цепи одного, двух, трех или более переменных доменов содержит V-сегмент переменной области зародышевой линии. В определенном варианте осуществления переменная область легкой цепи одного, двух, трех или более переменных доменов содержит V-сегмент легкой каппа-цепи IgVκ1-39*01. IgVκ1-39 представляет собой сокращение от гена переменной каппа-цепи иммуноглобулина 1-39. Ген также известен как переменный участок каппа иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39. Внешними идентификаторами для гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Аминокислотная последовательность для V-области обеспечена в последовательности 10, показанной на Фиг. 7. V-область может быть скомбинирована с одной из пяти J-областей. Предпочтительные J-области представляют собой jκ1 и jκ5, а соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jκ1 и IGKV1-39/jκ5; альтернативными названиями являются IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 (номенклатура дана в соответствии с базой данных IMGT, Интернет-адрес imgt.org). В определенных вариантах осуществления переменная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL содержит легкую каппа-цепь IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ1*05 (последовательность 11 или последовательность 12, изображенная на Фиг. 7 соответственно).

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного, двух, трех или более переменных доменов связывающихся функциональных групп

изобретения содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (последовательность 7 на Фиг. 7), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (последовательность 9 на Фиг. 7) (т. е. области CDR в IGKV1-39 в соответствии с IMGT). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного, двух, трех или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (последовательность 7 на Фиг. 7), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AASLQS (последовательность 8 на Фиг. 7), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (последовательность 9 на Фиг. 7).

В некоторых вариантах осуществления один, два, три или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в последовательности 11 на Фиг. 7. В некоторых вариантах осуществления один, два, три или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в последовательности 11 на Фиг. 7.

Например, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного, двух, трех или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения может иметь от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию по отношению к последовательности 11 на Фиг. 7 или последовательности 12 на Фиг. 7. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного, двух, трех или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию.

В других вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного, двух, трех или более вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит аминокислотную последовательность последовательности 11 по Фиг. 7 или последовательности 12 по Фиг. 7. В определенных вариантах осуществления все вариабельные домены связывающихся функциональных групп изобретения содержат идентичные области VL. В одном варианте осуществления VL всех вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности 11 на Фиг. 7. В одном варианте осуществления VL всех

вариабельных доменов связывающихся функциональных групп изобретения содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности 12 на Фиг. 7 или последовательности 12 на Фиг. 7.

5 Мультиспецифические антитела, такие как описанные в настоящем изобретении биспецифические антитела, могут быть представлены в нескольких форматах. В данной области известно множество различных форматов мультиспецифических антител, которые были рассмотрены в публикациях Kontermann (Drug Discov Today, 2015 Jul;20(7):838–47; MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97) и Spiess et al., (Alternative molecular
10 formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>), каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки. Например, форматы мультиспецифического антитела, такие как форматы биспецифического антитела, не являющиеся классическими антителами с двумя
15 вариабельными доменами, имеют по меньшей мере вариабельный домен, содержащий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Этот вариабельный домен может быть связан с одноцепочечным Fv-фрагментом, моноклоном, VHH и Fab-фрагментом, который обеспечивает вторую активность связывания.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические антитела, применяемые в способах, предложенных в настоящем изобретении, по существу
20 представляют собой человеческие антитела подкласса IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В определенных вариантах осуществления антитела относятся к человеческим антителам подкласса IgG1. Полноразмерные антитела IgG предпочтительны из-за подходящего периода полужизни и в связи с низкой иммуногенностью. Такие мультиспецифические антитела могут иметь две разные тяжелые цепи, содержащие
25 домен гетеродимеризации. Соответственно, в определенных вариантах осуществления биспецифические антитела к EGFR/HER2 и EGFR/HER3 представляют собой молекулы полноразмерного IgG. В варианте осуществления биспецифические антитела к EGFR/HER2 и EGFR/HER3 представляют собой молекулы полноразмерного IgG1.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления мультиспецифические антитела к EGFR/HER2 и EGFR/HER3 содержат кристаллизующийся фрагмент (Fc).
30 Области Fc мультиспецифических антител предпочтительно состоят из человеческой константной области. Константная область или Fc мультиспецифических антител может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных различий по сравнению с константной областью человеческого
35 антитела природного происхождения. Например, в определенных вариантах осуществления каждое Fab-плечо биспецифических антител может дополнительно включать область Fc, содержащую модификации, способствующие образованию биспецифического антитела, модификации, влияющие на опосредованные Fc эффекторные функции, и/или другие признаки, описанные в настоящем документе.

40 В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое, предпочтительно биспецифическое полноразмерное антитело IgG имеет такой нижний шарнирный домен и/или домен CH2, что взаимодействие указанного биспецифического антитела IgG с рецепторами Fc гамма (Fcγ) улучшается. Антителозависимая клеточная цитотоксичность, также называемая ADCC-активностью антитела, часто может быть
45 улучшена, если само антитело обладает низкой ADCC-активностью. Этого, например,

достигают путем удаления остатков фукозы из гликозилированной части антитела. Одна методика усиления ADCC посредством афукозилирования описана, например, в публикации Junttila, T. T., K. Parsons, et al. (2010). Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer. *Cancer Research* 70(11): 4481–4489). Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно является афукозилированным. Предпочтительно оба мультиспецифических антитела являются афукозилированными. Сообщается, что для достижения усиления ADCC используются другие стратегии, например, включающие гликоинженерию (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) и Eureka Therapeutics) и мутагенез (Хенсог и MacroGenics), причем в каждой из них стремятся улучшить связывание Fc с низкоаффинным активирующим FcγRIIIa и/или уменьшить связывание с низкоаффинным ингибирующим FcγRIIb.

Биспецифические антитела, как правило, продуцируются клетками, которые экспрессируют нуклеиновую (-ые) кислоту (-ы), кодирующую (-ие) антитело. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложен способ получения композиции, содержащей мультиспецифическое антитело, которое связывается с EGFR и HER2, и мультиспецифическое антитело, которое связывается с EGFR и HER3, включающий получение клетки, имеющей

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией для обеспечения экспрессии кодируемых тяжелой и легкой цепей в указанной клетке, и при этом способ дополнительно включает культивирование указанной клетки для обеспечения экспрессии указанных тяжелой и легкой цепей и необязательно сбор указанных двух или более антител. Два или более указанных антитела могут быть собраны из клеток и/или супернатанта.

Уровень продукции соответствующих цепей в клетке можно оптимизировать, например, путем выбора соответствующих последовательностей управления экспрессией или путем выбора числа введенных копий нуклеиновой кислоты или обоими способами. В предпочтительном варианте осуществления набор клеток получают с указанной нуклеиновой кислотой и выбирают клон, который экспрессирует соответствующие уровни соответствующих цепей. Клон также, как правило, выбирают на основе

количества продуцируемых антител. В одном варианте осуществления указанный способ включает получение набора клеток с указанной нуклеиновой кислотой и отбор из указанного набора клеток с желаемым соотношением экспрессии соответствующих тяжелых и легких цепей. В некоторых вариантах осуществления указанные две или более связывающихся функциональных групп представляют собой антитела, предпочтительно биспецифические антитела. В некоторых вариантах осуществления клетки предпочтительно продуцируют по существу эквимоллярные количества двух или более связывающихся функциональных групп. В других вариантах осуществления клетки вырабатывают больше одной связывающейся функциональной группы, чем другой, из указанных двух или более связывающихся функциональных групп.

В изобретении также обеспечена клетка, содержащая

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в указанной клетке.

В изобретении дополнительно обеспечен контейнер, содержащий нуклеиновую кислоту, представляющую собой

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2;
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в клетке.

Клетка, которая продуцирует связывающиеся функциональные группы, предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно человеческую клетку. Подходящая клетка представляет собой любую клетку, способную
 5 содержать и предпочтительно продуцировать связывающиеся функциональные группы, предпочтительно мультиспецифические антитела и предпочтительно биспецифические антитела, описанные в настоящем документе.

Подходящие клетки для продукции антител известны в данной области и
 10 включают клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0, клетку НЕК293, клетку 293-F или клетку PER-C6. Различные учреждения и компании разрабатывали клеточные линии для крупномасштабного получения антител, например для клинического использования. Не имеющими ограничительного характера примерами
 15 таких клеточных линий являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.C6. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой человеческую клетку. Предпочтительно клетка представляет собой клетку, трансформированную областью E1 аденовируса или ее функциональным эквивалентом. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительным является вариант, в котором для
 20 экспрессии антитела используют векторную систему, содержащую ген глутаминсинтетазы (GS). В одном предпочтительном варианте осуществления клетка представляет собой клетку CHO.

В определенных вариантах осуществления клетка экспрессирует три различные
 25 тяжелые цепи и по меньшей мере одну легкую цепь. В одном предпочтительном варианте осуществления клетка экспрессирует «общую легкую цепь», как описано в настоящем документе, для уменьшения числа различных видов антител (комбинаций различных тяжелых и легких цепей). Например, соответствующие области VH клонируют в
 30 экспрессионные векторы с использованием способов, известных в данной области, для продукции биспецифических IgG (WO2013/157954; включена в настоящий документ путем ссылки) в сочетании с перестроенной человеческой легкой цепью IGKV1 39/IGKJ1 (huVκ1 39). Ранее было показано, что huVκ139 может объединяться в пары с несколькими тяжелыми цепями и таким образом приводит к образованию антител с различной
 35 специфичностью, что облегчает создание биспецифических молекул (WO2009/157771).

Продуцирующая антитело клетка, которая экспрессирует общую легкую цепь и
 40 равные количества двух тяжелых цепей, как правило, продуцирует 50% биспецифического антитела и 25% каждого из моноспецифических антител (т. е. имеет идентичные комбинации тяжелых легких цепей). Опубликовано несколько способов, которые позволяют продуцировать больше биспецифических антител по сравнению с
 45 соответствующими моноспецифическими антителами. Как правило, этого достигают путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, чтобы они способствовали гетеродимеризации (т. е. димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелых/легких цепей) по сравнению с гомодимеризацией. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело изобретения

содержит две разные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. В данной области описаны различные совместимые домены гетеродимеризации. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации тяжелой цепи CH3

5 иммуноглобулина. В данной области описаны различные способы, которыми можно обеспечивать такую гетеродимеризацию тяжелых цепей.

Один предпочтительный способ продуцирования мультиспецифических антител, описанных в настоящем документе, описан в US 9,248,181 и US 9,358,286. В частности, предпочтительными мутациями для продуцирования по существу только молекул

10 биспецифического полноразмерного IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация EU) в первом домене CH3 (тяжелая цепь «варианта KK») и аминокислотные замены L351D и L368E во втором домене (тяжелая цепь «варианта DE»), или наоборот. Как было описано ранее, вариант DE и вариант KK предпочтительно объединяются в пару с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифических

15 молекул DEKK). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или KK-варианта тяжелых цепей (гомодимеры KKKK) происходит с трудом вследствие сильного отталкивания друг от друга заряженных остатков в области контакта CH3–CH3 между идентичными тяжелыми цепями. Посредством введения дополнительной тяжелой цепи, которая имеет тяжелую цепь варианта DE или варианта KK, можно продуцировать

20 дополнительную биспецифическую молекулу DEKK. Вновь введенная тяжелая цепь DE (DE²) может связываться с существующей тяжелой цепью KK. Таким образом, клетка продуцирует два биспецифических антитела: биспецифическое антитело DE¹KK и DE²KK. При введении новой тяжелой цепи KK (KK²) вместо новой тяжелой цепи DE получают биспецифические антитела с комбинациями DEKK¹ и DEKK². Концентрации, в

25 которых различные антитела могут продуцироваться клеткой, могут быть скорректированы путем регулировки относительной экспрессии цепей HER2 и HER3 относительно друг друга. Легкую цепь, как правило, продуцируют в степени, достаточной для снижения концентрации одиночных тяжелых цепей, а концентрации, в которой продуцируют цепи EGFR, как правило, достаточно для обеспечения

30 эффективного объединения в пары с цепями HER2, HER3.

Соответственно, в одном варианте осуществления комбинация тяжелая цепь / легкая цепь, которая содержит вариабельный домен, связывающийся с EGFR, содержит вариант DE тяжелой цепи. В этом варианте осуществления комбинация тяжелая цепь / легкая цепь, которая содержит вариабельный домен, который связывается с HER2, и

35 комбинация тяжелая цепь / легкая цепь, которая содержит вариабельный домен, который связывается с HER3, содержит вариант KK тяжелой цепи.

Потенциальное биспецифическое антитело IgG к EGFR/HER2 или EGFR/HER3 можно тестировать на связывание с использованием любого подходящего анализа.

40 Например, связывание с экспрессированными на мембране EGFR, HER2 или HER3. Это, как правило, выполняют на клетке, которая обычно не экспрессирует EGFR, HER2 или HER3 и которую трансформируют для экспрессии одного из EGFR, HER2 или HER3. Связывание антитела с трансформированной клеткой, а не с нетрансформированной клеткой, указывает на специфическое связывание антитела. Связывание может быть

45 выполнено, например, с помощью проточной цитометрии (в соответствии с процедурой

FACS, описанной ранее в WO2015/130172, PCT/NL2018/050537; и WO2015/130173.

Соответствующие моноспецифические антитела можно использовать наряду с контролями, а также нерелевантными контрольными mAb изотипа IgG1.

5 Связывающиеся функциональные группы, такие как антитела, можно собирать из клеток и/или супернатанта клеточной культуры. Как правило, их собирают из супернатанта продуцирующих клеток. Связывающиеся функциональные группы, такие как антитела, можно очищать из супернатанта. В данной области известно множество способов очистки. В некоторых более распространенных способах используют
10 аффинную очистку.

Антитела, продуцируемые клеткой, могут быть очищены путем аффинной очистки. Это преимущественно осуществляют посредством экстракции белка А. Элюированные антитела можно исследовать с помощью ИФА на наличие специфических
15 связывающих свойств (т. е. связывание с EGFR, с HER2 и HER3). Препарат антитела можно дополнительно анализировать с помощью ионообменной колоночной хроматографии. Отдельные биспецифические антитела могут быть очищены друг от друга обычными способами, например с помощью ионообменной хроматографии. Присутствие соответствующих биспецифических антител можно также анализировать с
20 помощью ИФА. Связывание препарата с HER2 и промывка должны удалять все антитела к EGFR/HER3. Окрашивание меченым растворимым HER3 не приводит к генерированию сигнала, тогда как окрашивание меченым растворимым EGFR приводит. Связывание препарата с HER3 и промывка должны удалять все антитела к EGFR/HER2. Окрашивание меченым растворимым HER2 не приводит к генерированию сигнала, тогда как
25 окрашивание меченым растворимым EGFR приводит. Связывание препарата с EGFR и промывка не должны удалять антитела к EGFR/HER2 и EGFR/HER3. При окрашивании меченым растворимым HER2 и окрашивании меченым растворимым HER3 должен возникать сигнал. Концентрации соответствующих антител в препарате можно также оценивать с помощью такого ИФА с соответствующими контролями с известными
30 концентрациями одиночного биспецифического антитела.

Способ получения композиции, содержащей два или более биспецифических антитела, включает

- обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей биспецифические антитела;
- культивирование указанных клеток;
- очистку полученных в результате культивации клеток;
- сбор биспецифических антител из культуры; и
- отделение полученных биспецифических антител от полуантител с помощью
40 ионообменной хроматографии (ИЕХ);

причем способ отличается тем, что биспецифические антитела демонстрируют схожие значения времени удерживания при ИЕХ, которые предпочтительно отклоняются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в используемых условиях ИЕХ. В одном варианте осуществления антитела выбирают таким
45 образом, чтобы они имели значения времени удерживания при ИЕХ, которые отклоняются

на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в используемых условиях IEX. Антитела могут быть сначала очищены от других белков в культуре. Как правило, для этого используют аффинную очистку, предпочтительно экстракцию белком А. Биспецифические антитела предпочтительно выбирают так, чтобы

5 они имели полуантитела со значениями времени удерживания, находящимися за пределами диапазона, охватываемого значениями времени удерживания антител. Если при продуцировании комбинации биспецифических антител моноспецифические антитела нежелательны, биспецифические антитела предпочтительно выбирают таким образом, чтобы значения времени удерживания отличались от значений времени

10 удерживания моноспецифических антител. Значения времени удерживания моноспецифических антител в этом варианте осуществления предпочтительно выходят за пределы диапазона, охватываемого значениями времени удерживания соответствующих биспецифических антител. Клетки в культуре предпочтительно одновременно экспрессируют три тяжелых цепи, причем тяжелые цепи содержат домены

15 гетеродимеризации CH3, которые способствуют образованию гетеродимеризации тяжелой цепи к EGFR/HER2 и EGFR/HER3. Клетки предпочтительно экспрессируют общую легкую цепь, показанную на Фиг. 7. Биспецифические антитела в одном варианте осуществления имеют изоэлектрические точки (PI), которые являются идентичными и предпочтительно не отличаются более чем на 0,5 единиц от среднего значения PI

20 указанных по меньшей мере двух биспецифических антител.

Аффинности FAB к HER2 и HER3 потенциального биспецифического антитела к EGFR/HER2 или EGFR/HER для их мишеней можно измерять с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием BIAcore T100. Мышиное

25 моноклональное антитело к человеческому IgG (Becton and Dickinson, кат. № 555784) соединяют с поверхностями датчикового чипа CM5 с использованием реакции со свободными аминами (NHS/EDC). Затем bsAb фиксируют на поверхности датчика. Впоследствии очищенные рекомбинантные антигены человеческого белка EGFR-Fc, HER2-Fc и HER3-Fc передвигали над поверхностью датчика в диапазоне концентраций

30 для измерения скоростей ассоциации и диссоциации. После каждого цикла поверхность датчика регенерируют потоком HCl и снова фиксируют bsAb. На основании полученных сенсограмм определяют скорости ассоциации и диссоциации и значения аффинности для связывания с человеческим EGFR, HER2 и HER3 с использованием программного обеспечения BIAevaluation.

35 В изобретении также обеспечена композиция, описанная в настоящем документе, для применения в лечении рака. В вариантах осуществления рак представляет собой солидный эпителиальный рак. Композицию предпочтительно используют для лечения рака, экспрессирующего EGFR, HER2 и/или HER3. Композицию предпочтительно используют для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака головы

40 и шеи, эпителиального рака яичников, эпителиального рака фаллопиевой трубы, эпителиального рака брюшины, рака мочевого пузыря или рака предстательной железы. В вариантах осуществления рак, подвергаемый лечению с применением композиции, представляет собой распространенный рак. Композицию предпочтительно используют для лечения метастатического рака. Композицию предпочтительно используют для

45 лечения метастатического рака поджелудочной железы, метастатического

- колоректального рака, метастатического рака головы и шеи, метастатического эпителиального рака яичников, метастатического эпителиального рака фаллопиевой трубы, метастатического эпителиального рака брюшины, метастатического рака мочевого пузыря или метастатического рака предстательной железы. В вариантах осуществления композицию предпочтительно используют для лечения рака, представляющего собой рак желудка, рак легкого, рак молочной железы или рак пищевода. Композицию предпочтительно используют для лечения метастатического рака желудка, метастатического рака легкого, метастатического рака молочной железы или метастатического рака пищевода.
- 10 В изобретении дополнительно обеспечены две или более связывающихся функциональных групп, причем каждая из них содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; причем первая из указанных связывающихся функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся
- 15 функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, для использования в лечении рака. Кроме того, обеспечен продукт, содержащий две или более связывающихся функциональных групп, причем каждая из них содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; причем первая из указанных связывающихся функциональных групп
- 20 содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, в качестве комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении рака.
- 25 Рак, подлежащий лечению с помощью вариантов осуществления изобретения, предпочтительно представляет собой рак, указанный в других разделах настоящего документа. Рак предпочтительно содержит клетки с мутацией EGFR, которая придает клетке резистентность к лечению ингибитором тирозинкиназы (TKI). В некоторых вариантах осуществления рак содержит клетки с полиморфизмом EGFR R521K. Рак,
- 30 подлежащий лечению, и способ лечения изобретения, описанный в настоящем документе, предпочтительно представляет собой рак желудка, рак легкого или рак пищевода. В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак или подверженного риску рецидива рака, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту двух или более связывающихся
- 35 функциональных групп, при этом каждая из них содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; при этом первая из указанных связывающихся функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с
- 40 внеклеточным участком HER3.

Используемые в настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и т. п. (например, пациент, такой как пациент-человек, страдающий раком).

Используемые в настоящем документе термины «лечить» и «лечение» относятся к любому типу вмешательства или способа, выполняемого по отношению к субъекту, или введению активного агента или комбинации активных агентов субъекту для изменения направления развития, ослабления, облегчения, ингибирования или замедления или предотвращения прогрессирующего, развития, ухудшения или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, обеспечивающему благоприятный эффект, например облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства, например рака. Благоприятный эффект может принимать форму улучшения относительно исходного уровня, включая улучшение по сравнению с измерением или наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии со способом. Например, благоприятный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или изменения направления развития рака у субъекта на любой клинической стадии, подтверждаемого снижением или устранением клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшать размер опухоли, уменьшать присутствие циркулирующих опухолевых клеток, уменьшать или предотвращать метастазы опухоли, замедлять или останавливать рост опухоли и/или предотвращать или задерживать повторное возникновение или рецидив опухоли.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента или комбинации агентов, которые обеспечивают желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этим результатом может быть уменьшение, облегчение, временное облегчение, уменьшение, задержка и/или ослабление одного или более признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желательное изменение биологической системы. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для замедления развития опухоли. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или замедления рецидивирования опухоли. Эффективное количество можно вводить за одну или более процедур введения. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшать число раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) подавлять, задерживать, в некоторой степени замедлять и может останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) подавлять метастазирование опухоли; (v) подавлять рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать возникновение и/или рецидивирование опухоли; и/или (vii) в некоторой степени ослаблять один или более симптомов, связанных с раком. В одном примере «эффективное количество» представляет собой количество композиции изобретения, индуцирующее уменьшение рака (например, уменьшение числа раковых клеток) или замедление прогрессирующего рака. Эффективное количество комбинированной терапии вводят в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, в рамках «эффективной схемы», относящейся к комбинации связывающихся функциональных групп, указанных в настоящем документе, причем порядок введения и частота дозирования приемлемы для осуществления лечения.

При использовании в настоящем документе термины «синергия», «терапевтическая синергия» и «синергетический эффект» относятся к явлению, при котором лечение пациентов комбинацией связывающихся функциональных групп, указанных в настоящем документе (например, композицией, содержащей

5 связывающуюся функциональную группу, которая связывается с EGFR и HER2, и связывающуюся функциональную группу, которая связывается с EGFR и HER3) приводит к терапевтически лучшему результату по сравнению с результатом, достигнутым путем использования каждого компонента комбинации по отдельности (см., например, Т. Н. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187). В этом контексте

10 терапевтически лучший результат включает одно или более из следующего:

(а) увеличение терапевтического ответа выше суммы отдельных эффектов каждой связывающейся функциональной группы отдельно в той же дозе, что и в комбинации;

(b) снижение дозы одного или более агентов в комбинации без снижения терапевтической эффективности; (с) снижение частоты возникновения неблагоприятных

15 явлений с одновременным достижением терапевтического эффекта, равного или превышающего таковой при монотерапии каждым агентом в той же дозе, что и в комбинации; (d) снижение дозолимитирующей токсичности с одновременным достижением терапевтического благоприятного эффекта, превышающего таковой при монотерапии каждым агентом; (е) задержка или сведение к минимуму индукции

20 резистентности к лекарственному средству.

В моделях ксенотранспланта комбинация, применяемая в максимальной переносимой дозе, в которой каждый из компонентов будет присутствовать в дозе, по существу не превышающей его индивидуальную максимальную переносимую дозу,

25 проявляет терапевтическую синергию, т. е. уменьшение роста опухоли, достигаемое при введении комбинации, превышает значение снижения роста опухоли, достигаемое наилучшим компонентом при введении его в качестве монотерапии. Синергизм комбинации лекарственных средств можно определить, например, в соответствии с теоремой показателя аддитивности (CI) Чоу-Талалай (Chou et al., Adv. Enzyme Regul.

30 1984; 22:27–55; Chou, Cancer Res. 2010;70(2):440–446).

В изобретении дополнительно обеспечена композиция изобретения для применения в лечении рака. Используемый вариант осуществления предпочтительно предназначен для лечения рака желудка, колоректального рака, рака толстой кишки, рака

35 желудка и пищевода, рака пищевода, рака эндометрия, рака яичников, рака печени, рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточной саркомы, рака слюнной железы, рака головы и шеи, рака головного мозга, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи, меланомы и т. п. Один вариант осуществления предназначен для лечения рака желудка, рака

40 легкого или рака пищевода. Применение предпочтительно обеспечивает лечение рака, представляющего собой рак желудка.

Описанное в настоящем документе изобретение относится к лечению рака, который предпочтительно представляет собой рак, исследуемый на наличие на клеточной мембране EGFR, HER2 и/или HER3. Это можно сделать стандартными способами и, как

45 правило, анализировать посредством иммуногистохимического анализа.

Рак предпочтительно экспрессирует HER2. Рак также предпочтительно экспрессирует EGFR или HER3. Рак предпочтительно экспрессирует EGFR. Рак предпочтительно также экспрессирует HER2 или HER3. Рак предпочтительно экспрессирует HER3. Рак также предпочтительно экспрессирует EGFR или HER2. В некоторых вариантах осуществления клетки рака и/или стромальные клетки рака, леченного с помощью изобретения, описанного в настоящем документе, экспрессируют лиганд EGFR, лиганд HER3 или и то и другое. Таким образом, экспрессия лиганда и рецептора может стимулировать рост клеток рака. Комбинация изобретения особенно подходит для лечения раковых опухолей, содержащих такие клетки.

Экспрессия одного из EGFR, HER2 и HER3 при лечении изобретения может по меньшей мере замедлять развитие резистентности некоторых опухолей. Опухоли, на которые нацелена моноспецифическая терапия, могут получить резистентность, начав экспрессировать другой из EGFR, HER2 или HER3 или экспрессировать лиганд рецептора.

Такие клетки, если они появляются, также атакуются связывающимися функциональными группами изобретения и могут, следовательно, быть уничтожены до их роста и диверсификации. В одном варианте осуществления рак исследуют на наличие мутированного EGFR. Многие EGFR-положительные опухоли имеют мутацию в гене, которая придает клеткам устойчивость к лечению ингибитором тирозинкиназы.

Композиция изобретения подходит для лечения рака с мутацией EGFR, которая придает раковым клеткам устойчивость к лечению ингибитором тирозинкиназы (TKI). В одном варианте осуществления рак содержит клетки с полиморфизмом EGFR R521K. В некоторых вариантах осуществления известно, что рак является резистентным к ингибиторам TKI первого поколения, таким как gefitinib и erlotinib.

Лечение рака, описанное в настоящем документе, можно комбинировать с дополнительными видами лечения рака. Такое лечение может предусматривать дополнительную связывающуюся функциональную группу, такую как антитело и/или цитостатическое лекарственное средство, или ингибитор протеинкиназы. Ингибитор протеинкиназы предпочтительно представляет собой ингибитор, отличный от ингибитора тирозинкиназы EGFR или HER3. Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных видов лечения предусматривают радиотерапию, химиотерапию, хирургическое вмешательство, терапию с ингибированием роста сосудов и тепловую терапию.

Композиция изобретения может подходить для применения в лечении рака, резистентного к ингибированию EGFR, причем резистентность к EGFR является результатом сверхэкспрессии HER2 и/или HER3.

Композиция изобретения может подходить для применения в лечении рака, резистентного к ингибированию HER2, причем резистентность к HER2 является результатом сверхэкспрессии EGFR и/или HER3.

Композиция изобретения может подходить для применения в лечении рака, резистентного к ингибированию HER3, причем резистентность к HER3 является результатом сверхэкспрессии EGFR и/или HER2.

Термин Oligoclonics® в контексте антител, связывающихся функциональных групп, композиций или продуктов, описанных в настоящем документе, относится к наличию более одного и, как правило, 10 или менее разных антител или связывающихся функциональных групп в одном препарате, включая наличие биспецифического антитела. Пример Oligoclonics® включает комбинацию двух биспецифических антител.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF3755, MF4280, MF4003 или MF4016, изображенные на Фиг. 8, или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF2032 или MF1849, или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

Кроме того, обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF3755 изображенную на Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF2032, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF3755, MF4280, MF4003 или MF4016, изображенные на Фиг. 8, или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF2032 или MF1849, или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR

содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF3755, изображенную на Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF2032, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

Кроме того, обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF3755 изображенную на Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи MF1849, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

В изобретении дополнительно обеспечена связывающаяся функциональная группа или биспецифическое антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2; причем переменный домен EFGR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF3755, изображенную на Фиг. 8, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2, или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR, и при этом переменный домен HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи MF1849, или ее вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот, которые предпочтительно не находятся в CDR.

Для ясности и краткости описания в настоящем документе признаки описаны в составе одного и того же или отдельных вариантов осуществления, однако следует понимать, что объем изобретения может включать варианты осуществления, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1

Схематическое представление вариантов осуществления, в которых композиция содержит два биспецифических антитела, имеющих общее плечо. На фигуре показаны антитела с тяжелыми цепями (1) и легкими цепями (4). Четыре тяжелые цепи имеют три различные переменные области (5, 6 и 7). Тяжелая цепь, которая имеет общую переменную область (5), имеет одну часть (3) домена гетеродимеризации. Тяжелые цепи с переменными областями (6) и (7) имеют совместимую часть домена (2) гетеродимеризации. Предпочтительное объединение в пару областей (2) и (3) гетеродимеризации может приводить к образованию биспецифических антител.

Фиг. 2

Ингибирующее влияние двух Oligoclones® на пролиферацию зависимых от фактора роста клеточных линий VxPC-3-luc2 (Perkin Elmer 125058) и клеток N87 (клетка NCI-87 (ATCC® CRL-5822™)).

Два Oligoclones® исследовали на предмет влияния на пролиферацию клеток VxPC-3-luc2 (левая панель) и N87 (правая панель). Результаты скрининга панели сравнивали с комбинацией двух моноспецифических антител (связывающееся с EGFR антитело цетуксимаб и моноспецифическое антитело к HER3 PG3178) или с биспецифическим антителом к EGFRxHER3 PB4522. Клетки выращивали в присутствии насыщающих количеств HRG и EGF. Указан уровень роста соответствующих клеток с HRG и EGF и без антител (базальный уровень с лигандом), а также базальный уровень без HRG и EGF и без антител (без лиганда).

Моноспецифическое антитело PG3178 имеет константную область IgG1 и два переменных домена с переменной областью тяжелой цепи MF3178, показанной на Фиг. 7 или Фиг. 8, и переменной областью общей легкой цепи последовательности 11, показанной на Фиг. 7).

Биспецифическое антитело PB4522 имеет константную область IgG1 и два переменных домена. Переменный домен HER3 имеет переменную область тяжелой цепи MF3178, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8. Переменный домен EGFR имеет переменную область тяжелой цепи MF4280, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8. Переменная область легкой цепи в обоих антителах одинакова и имеет аминокислотную последовательность переменной области общей легкой цепи последовательности 11, показанной на Фиг. 7).

Фиг. 3

ADCC-активность панели Oligoclones®. ADCC-активность панели Oligoclones® исследовали с использованием анализа по гену-репортеру N87 и CD16/NFAT.

Биспецифические антитела имеют константную область IgG1 и два переменных домена. Аминокислотная последовательность переменных областей тяжелой цепи переменных доменов показана на Фиг. 7 или Фиг. 8. Переменная область легкой цепи в антителах одинакова и имеет аминокислотную последовательность переменной области общей легкой цепи последовательности 11, показанной на Фиг. 7.

Фиг. 4

Нумерация и специфичность различных Oligoclronics® и их ADCC-активность. «-» обозначает, что активности не было выявлено.

- В каждой строке представлены Oligoclronics®, содержащие два биспецифических антитела. Внутренний код биспецифических антител указан в столбцах биспецифическое антитело 1 и 2. Варибельная область тяжелой цепи связывающихся с HER2, HER3 и EGFR доменов указана в столбцах, обозначенных MF A, MF B и MF C. MF с номерами 3178 и 2703 образуют связывающийся с HER3 варибельный домен в комбинации с общей легкой цепью. MF с номерами 4280, 3755, 4003, 4016 образуют связывающийся с EGFR варибельный домен в комбинации с общей легкой цепью, а MF с номерами 1871, 1847, 1849 и 2032 образуют связывающийся с HER2 варибельный домен в комбинации с общей легкой цепью. Биспецифические антитела имеют константную область IgG1 и два варибельных домена. Аминокислотная последовательность варибельных областей тяжелой цепи варибельных доменов показана на Фиг. 7 или Фиг. 8. Варибельная область легкой цепи в антителах одинакова и имеет аминокислотную последовательность варибельной области общей легкой цепи последовательности 11, показанной на Фиг. 7.

Фиг. 5

- Тестирование Oligoclronics® *in vivo*. Клетки ВхРС-3-luc2 или N87 вводили в модель ксенотрансплантата в день 0. Препараты Oligoclronics®, содержащие биспецифические антитела PB4516 x PB6892 (см. Фиг. 4) или контрольные антитела, вводили в дни 1, 7, 14, 21 и 28. Антитела вводили внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг. Показаны результаты для Oligoclronics® (PB4516 и PB6892). В качестве контролей использовали несущую среду и цетуксимаб.

Фиг. 6

- Исследование *in vivo* Oligoclronics®, содержащих биспецифические антитела PB4516 и PB6892, в различных моделях PDX.
- Модели PDX вводили в день 0, а обработку антителом или контролями проводили в дни 1, 7, 14, 21 и 28. Антитела вводили внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг.

Фиг. 7

- В отношении аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелой цепи различных варибельных доменов, обозначенных номером MF, см. номера последовательностей 1–6, а в отношении CDR и варибельных областей легкой цепи см. номера последовательностей 7–12.

Фиг. 8

- Аминокислотные последовательности различных MF, упомянутых в настоящем документе. FR1–4 означают каркасные области 1–4. CDR1–3 означают определяющие комплементарность области 1–3. TT представляет собой столбчатый анатоксин.

Фиг. 9

- а) Кристаллическая структура HER3 (PDB №4P59), показывающая остаток Arg 426 в виде серых шариков и остатки в пределах радиуса 11,2 Å относительно Arg 426 в виде черных шариков. б) Остаток Arg 426 и удаленные остатки показаны серым цветом в пределах радиуса 11,2 Å относительно Arg 426, показанного черным цветом. в) Остатки в области Arg 426 показаны светло-серым цветом и окружающие остатки (все помеченные) темно-серым цветом. Получали фигуры и выполняли анализы с использованием Yasara (www.yasara.org).

ПРИМЕРЫ

10

Клеточные линии

Клетки Hek293, клетки NCI-87 (ATCC® CRL-5822™, ВхРС-3 (ATCC CRL-1687), ВхРС-3-luc2 и СНО-К1 поддерживали в ростовой среде с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (FBS)

15

Создание биспецифических антител

- Биспецифические антитела создавали с использованием описанной технологии DEKK СНЗ для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифического антитела. В технологии СНЗ применяют точечные мутации на основе заряда в области СНЗ для обеспечения эффективного объединения в пары двух различных молекул тяжелой цепи, как описано ранее (WO 2013/157954 A1).

- Ген VH клонировали в одном из двух различных векторов каркаса IgG1. В зависимости от партнера по связыванию VH клонировали в каркасе IgG1, содержащем вариант СНЗ с вариантом гетеродимеризации DE, или в каркасе IgG1, содержащем комплементарный вариант гетеродимеризации СНЗ КК. В случае би- или мультиспецифических антител, в которых два или более антител имеют общую тяжелую цепь. Общая цепь предпочтительно имеет вариант гетеродимеризации СНЗ DE (также называемый тяжелой цепью DE), а две или более уникальных тяжелых цепей имеют вариант гетеродимеризации СНЗ КК (также называемый тяжелой цепью КК).

- Прикрепленные клетки Hek293 культивировали в 6-луночных планшетах до конфлюентности 80%. Клетки временно трансфицировали смесями ДНК-FUGENE и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции супернатант собирали и обновляли среду. Через четырнадцать дней после трансфекции супернатанты объединяли и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Стерильный супернатант хранили при 4 °С. Приспособленные для суспензии клетки Hek293 культивировали во флаконах T125 на шейкере до получения плотности 3,0 x 10⁶ клеток/мл. Клетки высевали с плотностью 0,3–0,5 x 10⁶ жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки временно трансфицировали отдельными стерильными смесями ДНК: PEI-MIX и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции супернатант собирали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Стерильный супернатант хранили при 4 °С.

Создание стабильных пулов клеточной линии, которые совместно экспрессируют два биспецифических антитела

- Клетки CHO трансфицировали тремя конструктами тяжелой цепи и конструктом общей легкой цепи в молярном соотношении конструкта общей легкой цепи (cLC): тяжелая цепь EGFR : тяжелая цепь HER2 : тяжелая цепь HER3 = 2,5 : 2 : 1 : 1. Получено десять пулов стабильно трансфицированных клеток (А–J). Анализ ИФА антител к EGFR, к HER2 и к HER3 проводили на супернатантах 10 пулов в день 3 и день 6. Все 3 вида были обнаружены во всех пулах.

- 10 Стабильные клоны клеточной линии, которые совместно экспрессируют два биспецифических антитела, получали путем посева пулов в полутвердую среду. Высеянные клетки оставляли для выращивания на 7–10 дней. Два цикла клонирования одиночных клеток проводили путем посева и отбора одиночных колоний. Oligoclonics получали из одиночной клетки путем периодической ферментации с подпиткой.

15

Определение титра антител

- Клеточные супернатанты разводили в соотношении 1 : 4 и 1 : 50 в PBS в расчете на общую концентрацию IgG. Сначала проводили ИФА с одним антигеном для обнаружения присутствия всех трех видов антител. Для покрытия лунок планшета для ИФА использовали следующие антигены в концентрации 2,5 мкг/мл: рекомбинантный человеческий EGFR-ECD Fc (R&D Systems, 344-ER), рекомбинантный человеческий ErbB2-ECD Fc (R&D Systems, 1129-ER) и рекомбинантный человеческий ErbB3-ECD Fc (R&D Systems, 348-ER).

- 25 Затем были разработаны два сэндвич-метода ИФА для обнаружения и количественного определения двух биспецифических молекул, что позволяло оценить соотношение между двумя биспецифическими антителами. Для обнаружения биспецифических антител к EGFRxHER2 на лунки наносили антиген EGFR-Fc (R&D Systems, 344-ER) и обнаруживали с помощью ErbB2-Fc (R&D Systems, 1129-ER). Для обнаружения биспецифических антител к EGFRxHER3 на лунки наносили антиген EGFR-Fc, который обнаруживали с помощью ErbB3-Fc (R&D Systems, 348-RB).

Очистка IgG

- Очистку IgG выполняли с помощью аффинной хроматографии. Очистки проводили в стерильных условиях с применением вакуумной фильтрации. Сначала pH среды доводили до 8,0, а затем продукты инкубировали с гранулами сефарозы CL-4B, связанными с белком А (50% об./об.) (Pierce), в течение 2 часов при 25 °C на шейкере при 600 об/мин. Затем гранулы собирали вакуумным фильтрованием. Гранулы дважды промывали PBS с pH 7,4. IgG элюировали при pH 3,0 с использованием 0,1 М цитратного буфера, а фракцию IgG сразу же нейтрализовали с помощью трис-буфера с pH 8,0.
- 40 Замену буфера выполняли путем центрифугирования, используя планшеты Ultracel (Millipore). Образцы помещали в конечный буферный раствор, представляющий собой PBS с pH 7,4.

Катионообменная хроматография (CIEX)

- Хроматографию СЕХ-ВЭЖХ проводили с использованием ионообменных колонок серии TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.), Tosoh 21964). Колонки заполняют непористыми частицами смолы для скоростного анализа высокого разрешения, а также выделения биомолекул. Частицы в колонках TSKgel STAT содержат сеть с открытым доступом многослойных ионообменных групп для увеличения загрузочной способности, а относительно крупный размер частиц позволяет использовать эти колонки для систем ВЭЖХ и FPLC.
- 10 TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.), Tosoh 21964) уравнивают с использованием буфера А (натрий-фосфатный буфер, 25 мМ, рН 6,0), после чего антитела вытесняют из колонки путем повышения концентрации соли и создания градиента буфера В (25 мМ фосфата натрия, 1 мМ NaCl, рН 6,0). Скорость потока устанавливали равной 0,5 мл/мин. Масса всех вводимых исследуемых образцов и
- 15 контролей (в PBS) составляла 10 мкг, а вводимые объемы составляли 10–100 мкл. Хроматограммы анализировали в отношении структуры пиков, значений времени удерживания и площадей основных пиков, наблюдаемых на основании результатов оценки при 220 нм.
- 20 *Анализ ингибирования роста BxPC-3-luc2 и N87*
Композиции антител исследовали в диапазоне концентраций общего числа антител. Антитела объединяли два по два в расчете на равные количества массы по массе. HRG и EGF добавляли к культуре в концентрации 0,1 нг/мл EGF и 10 нг/мл HRG для клеток BxPC3-luc2 или 0,1 нг/мл EGF и 1 нг/мл HRG для клеток N87. Базальным уровнем с
- 25 лигандом был контроль без антитела, но с соответствующими факторами роста. Базальным уровнем без лиганда был контроль без указанных факторов роста и без антитела.
- 30 Антитела разводили в голодной среде с определенным химическим составом (CDS: среда RPMI 1640, содержащая 80 ед. пенициллина и 80 мкг стрептомицина на мл, 0,05% (масса/объем) BSA и 10 мкг/мл голотрансферрина) и 50 мкл разведенного антитела добавляли в лунки 96-луночного черного планшета с прозрачным дном (Costar). Лиганды добавляли (50 мкл на лунку маточного раствора, содержащего 40 нг/мл или 4 нг/мл HRG и 400 нг/мл EGF, разведенного в CDS: R&D systems, кат. № 396-HB и 236-EG). Планшеты
- 35 оставляли на час при кт, после чего помещали в контейнер в инкубаторе для клеточных культур при 37 °C на три дня (клетки N87) или четыре дня (клетки BxPC-3-luc2). На четвертый день добавляли Alamar Blue (Invitrogen, № DAL1100) (20 мкл на лунку) и измеряли флуоресценцию через 6 часов (клетки N87) или четыре часа (клетки BxPC-3-luc2) инкубации (при 37 °C) с Alamar Blue с использованием длины волны возбуждения
- 40 560 нм и считывания при 590 нм на многорежимном микропланшетном спектрофотометре Biotek Synergy 2. Значения флуоресценции нормализовали к неингибированному росту (без антитела, но с добавлением обоих лигандов).

ADCC-активность для различных Oligoclones®

- Для оценки ADCC применяли анализ по гену-репортеру (Promega). Исследовали две разные клеточные линии; экспрессирующая EGFR клеточная линия рака поджелудочной железы BxPC3 и клеточная линия карциномы желудка N87.
- В биоанализе используют модифицированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие либо вариант рецептора FcγRIIIa V158 (высокоаффинный), либо элемент ответа NFAT, инициирующий экспрессию люциферазы светляка, что является показателем активации FcγR. Анализ был подвергнут валидации путем сравнения данных, полученных с помощью данного биоанализа по гену-репортеру для оценки ADCC, с классическим анализом на высвобождение ⁵¹Cr, и оба анализа предоставляли аналогичные результаты. Анализы ADCC проводили с использованием набора для анализа Promega ADCC Bioassay с применением 384-луночных планшетов с белыми лунками. В этих экспериментальных условиях клетки BxPC3 и клетки N87 высевали с плотностью 1000 клеток/лунка в 30 мкл среды для анализа (RPMI с добавлением 4% сыворотки с низким содержанием IgG) за 20–24 ч до биоанализа. На следующий день культуральную среду удаляли. Затем готовили серийное разведение Oligoclones® и антитела сравнения (цетуксимаб) в двух повторениях. В лунки добавляли по 10 мкл этих разведенных антител. Кроме того, использовали контрольные лунки без антитела (базальный уровень).
- Из начальных концентраций антител были получены 5-кратные серийные разведения для получения кривых зависимости эффекта от дозы. Наконец, добавляли 5 мкл эффекторных клеток для биоанализа ADCC (15 000 клеток/лунка, V158). Обработанные клетки инкубировали в течение 6 часов при 37 °C. Затем добавляли 15 мкл субстрата люциферазы BIO-Glo и через 5 минут после этого обнаруживали люминесценцию в планшетном спектрофотометре. Полученные данные показаны на Фиг. 3. Цетуксимаб продемонстрировал ADCC-активность в отношении клеток BxPC3 и N87. Различные олигоклональные антитела также демонстрировали ADCC-активность на клетках BxPC3 и/или N87.
- Исследование влияния Oligoclones®, содержащих биспецифические антитела PB4516 и PB6892, на рост опухолей BxPC-3-luc2 (имплантированных ортотопно) и опухолей N87 (клетки желудка, имплантированные в бок животного)*

- Самкам мышей линии CB17 SCID в возрасте 8–10 недель в начале исследования ортопедически трансплантировали 1×10^6 опухолевых клеток BxPC-3-luc2 в 20 мкл в поджелудочную железу. Мышей анестезировали и укладывали на правую сторону таким образом, чтобы был доступ к левой стороне, после чего на области левого бока выполняли разрез длиной 0,5 см. Поджелудочную железу и селезенку извлекали и вводили 1×10^6 опухолевых клеток в 20 мкл в подкапсульное пространство хвоста поджелудочной железы. Через одну неделю после имплантации генерировали данные биолюминесценции (BLI). Для визуализации BLI (один или два раза в неделю) с получением вида слева все мыши получали интраперитонеальные инъекции 150 мг/кг люциферина (калиевая соль D-люциферина-EF, кат. № E6552, Promega) за 15 минут до визуализации. Животных с выпадающими значениями на основании BLI / объем опухоли

удаляли, а мышей случайным образом распределяли в группы по 7 мышей в каждой. Обработку начинали в день 8 эксперимента.

- Животным в группе, получавшей лечение антителом, вводили 0,3 мг/кг антитела еженедельно в течение 4 недель подряд (дни 0, 7, 14 и 21). В день 0 лечения животные получали дозу, вдвое превышающую насыщающую, т. е. 0,6 мг/кг антитела. Окончательную визуализацию проводили в день 35 или день 40. В качестве контролей использовали группы, получавшие только лечение несущей средой и цетуксимабом. Цетуксимаб и Oligoclomics значительно снижали разрастание опухоли BxPC-3 в модели ($p < 0,05$) (Фиг. 5). Разрастание опухоли при использовании Oligoclomics® PB4516 и PB6892 было заметно меньше, чем при использовании цетуксимаба. Цетуксимаб значимо не снижал разрастание клеток N87. Oligoclomics® значимо снижали разрастание опухоли N87 в модели ($p < 0,05$) (Фиг. 5).

Опухоль N87

- Самкам мышей линии CB17 SCID в возрасте 8–12 недель в начале исследования инокулировали 1×10^7 опухолевых клеток N87 в 50% Matrigel п/к в бок. Вводимый объем клеток составлял 0,2 мл/мышь. Лечение начинали, когда опухоли достигали среднего размера 150–200 мм³. Антитела вводили мышам один раз в неделю в течение 4 недель путем внутрибрюшинных инъекций в дозе 25 мг/кг. Массу тела измеряли один раз в неделю после инъекции опухолевых клеток и два раза в неделю после начала лечения и до конца. Рост опухоли контролировали путем измерения штангенциркулем два раза в неделю. Конечный показатель эксперимента представлял собой объем опухоли 800 мм³ или 60 дней, в зависимости от того, что было достигнуто раньше.

25 Активность Oligoclomics® PB11244 и PB4516 в различных моделях PDX

- Активность Oligoclomics®, содержащих биспецифические антитела PB11244 и PB4516, оценивали в нескольких моделях PDX. Исследование потенциальных терапевтических средств в большом количестве моделей рака упрощает прогнозирование клинической эффективности и может выявлять факторы для стратегий выбора пациентов.

Биспецифические антитела PB4516 и PB11244 имеют константную область IgG1 и два переменных домена.

- 35 Варибельный домен HER3 PB4516 имеет переменную область тяжелой цепи MF3178, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8. Варибельный домен EGFR имеет переменную область тяжелой цепи MF3755, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8.

- 40 Варибельный домен HER2 PB11244 имеет переменную область тяжелой цепи MF2032, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8. Варибельный домен EGFR имеет переменную область тяжелой цепи MF3755, показанную на Фиг. 7 или Фиг. 8.

- 45 Варибельная область легкой цепи в обоих антителах была одинаковой и имела аминокислотную последовательность переменной области общей легкой цепи SEQ ID NO: 11, показанной на Фиг. 7)

Выбирали несколько моделей PDX рака желудка, пищевода и немелкоклеточного рака легкого (Фиг. 6).

- 5 Получали и очищали Oligoclones®, содержащие биспецифические антитела PB4516 и PB11244. Антитела смешивали в соотношении 1 : 1. Oligoclones® исследовали в моделях и сравнивали с цетуксимабом и несущей средой (PBS).

- 10 Модели PDX сначала подкожно (п/к) размножали у донорских бестимусных мышей BALB/c. Опухоли извлекали, нарезали на небольшие кусочки (диаметром 2–3 мм) и имплантировали п/к новым акцепторным бестимусным мышам BALB/c. Реципиентами опухолей были самки бестимусных мышей BALB/c в возрасте 6–8 недель. Рост опухолей отслеживали путем измерения штангенциркулем до тех пор, пока средний размер опухолей не достигал 100–200 мм³. На этой стадии, фиксируемой как день 1, животных рандомизировали в 3 группы для каждой модели. Лечение начинали в один и тот же день и оно включало:

- 20 - PB4516 x PB689225 мг/кг, 5 доз один раз в неделю, внутрибрюшинная инъекция;
 - цетуксимаб 25 мг/кг, 5 доз один раз в неделю, внутрибрюшинная инъекция;
 - несущая среда (PBS), 5 доз один раз в неделю, внутрибрюшинная инъекция.

- 25 Можно видеть, что препараты Oligoclones® существенно снижали разрастание опухолевых клеток в модели. Снижение разрастания было таким же или лучше, чем при использовании цетуксимаба.

Таблица 1. Перечень остатков в пределах радиуса 11,2 Å Arg 426 в HER3

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая две или более связывающих функциональных групп, причем каждая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3.
2. Композиция по п. 1, в которой по меньшей мере одна, а предпочтительно по меньшей мере две из двух или более связывающих функциональных групп представляют собой антитело.
3. Композиция по п. 1 или п. 2, в которой по меньшей мере одна, а предпочтительно по меньшей мере две из двух или более связывающих функциональных групп представляют собой IgG.
4. Композиция по п. 2 или п. 3, в которой области CH3 тяжелых цепей первого и/или второго антитела сконструированы с возможностью облегчения гетеродимеризации тяжелой цепи со связывающим EGFR переменным доменом и тяжелой цепи со связывающим HER2 переменным доменом, и/или связывающим EGFR переменным доменом и тяжелой цепи со связывающим HER3 переменным доменом.
5. Композиция по любому из пп. 2–4, в которой по меньшей мере одно, а предпочтительно по меньшей мере два из двух или более антител представляют собой биспецифическое антитело.
6. Композиция по любому из пп. 2–5, в которой переменные домены, которые связываются с внеклеточным участком EGFR первого и второго антитела, содержат по существу одинаковую переменную область тяжелой цепи.
7. Композиция по любому из пп. 2–6, в которой переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, связывает домен I или домен III EGFR, предпочтительно домен III.
8. Композиция по любому из пп. 2–7, в которой переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, связывает домен I или домен IV HER2, предпочтительно домен IV.
9. Композиция по любому из пп. 2–8, в которой переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, связывает домен III HER3.
10. Композиция по любому из пп. 6–9, в которой переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, связывает домен I или домен III EGFR,

предпочтительно домен III; причем вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, связывает домен I или домен IV HER2, предпочтительно домен IV; и при этом вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, связывает домен III HER3.

11. Композиция по п. 9 или п. 10, в которой вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, связывается по меньшей мере с R426 домена III HER3

12. Композиция по любому из пп. 9–11, в которой аффинность (KD) вариабельного домена, который связывается с внеклеточным участком HER3, в отношении связывания с HER3-положительной клеткой SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™) составляет 2,0 нМ или менее, предпочтительно от 2,0 до 0,1 нМ.

13. Композиция по любому из пп. 1–12, в которой связывание вариабельного домена, который связывает EGFR с EGFR, блокирует связывание EGF с EGFR, и/или при этом связывание вариабельного домена, который связывает HER3 с HER3, блокирует связывание нейрегулина 1 (NRG) с HER3.

14. Композиция по любому из пп. 1–13, в которой вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

15. Композиция по любому из пп. 1–14, в которой вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 SYGMH, последовательность CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG и последовательность CDR3 DYYRRTARAGFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

16. Композиция по любому из пп. 1–15, в которой вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 GYYMH, последовательность CDR2 WINPNSGGTNYAQKFQG и последовательность CDR3 DHGSRHFWSYWGFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

17. Композиция по любому из пп. 1–16,
- в которой вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 NYAMN, последовательность CDR2 WINANTGDPTYAQGFTG и последовательность CDR3 ERFLEWLHFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR;

- причем вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность

CDR1 SYGMH, последовательность CDR2 VISYDGSNKYYYADSVKG и последовательность CDR3 DYYRRTARAGFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR; и

- при этом вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 GYYMH, последовательность CDR2 WINPNSGGTNYAQKFQG и последовательность CDR3 DHGSRHFWSYWGFDY или их вариант, содержащий замену, делецию и/или вставку 1, 2 или 3 аминокислот в CDR.

18. Композиция по любому из пп. 1–17 для применения в лечении.

19. Композиция по п. 18 для применения в лечении рака, предпочтительно рака желудка, рака легкого или рака пищевода.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1–17.

21. Две или более связывающих функциональных групп, причем каждая из них содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; при этом первая из указанных связывающих функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающих функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, для применения в лечении рака, предпочтительно рака желудка, рака легкого или рака пищевода.

22. Продукт, содержащий две или более связывающих функциональных групп, причем каждая из указанных связывающих функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первая из указанных связывающих функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающихся функциональных групп содержит вариабельный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3, в качестве комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении рака, предпочтительно рака желудка, рака легкого или рака пищевода.

23. Композиция, фармацевтическая композиция, связывающие функциональные группы или продукт для применения по любому из пп. 18–22, где рак содержит клетки с мутацией EGFR, которая придает клетке устойчивость к лечению ингибитором тирозинкиназы (TKI).

24. Композиция, фармацевтическая композиция, связывающие функциональные группы или продукт для применения по любому из пп. 18–23, причем рак содержит клетки с полиморфизмом EGFR R521K.

25. Композиция, связывающие функциональные группы или продукт для применения по любому из пп. 1–24, где рак представляет собой рак желудка.

26. Способ лечения субъекта, страдающего от рака или подверженного риску рецидива рака, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества двух или более связывающих функциональных групп, при этом каждая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR; и при этом первая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2, а вторая из указанных связывающих функциональных групп содержит переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3.

27. Способ получения композиции по любому из пп. 1–19, включающий:
получение клетки, содержащей

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком EGFR;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с указанной общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком HER2;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с указанной общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком HER3; и

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем необязательно две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в указанной клетке; и

культивирование указанной клетки для обеспечения экспрессии указанных тяжелой и легкой цепей; и необязательно

восстановление указанных двух или более связывающих функциональных групп.

28. Способ по п. 27, включающий обеспечение множества клеток с указанными нуклеиновыми кислотами и отбор из указанного набора клетки с желаемым соотношением экспрессии тяжелых и легких цепей.

29. Способ по п. 27 или п. 28, в котором указанные две или более связывающих функциональных групп представляют собой антитела, предпочтительно биспецифические антитела.

30. Способ по любому из пп. 27–29, в котором клетки продуцируют по существу эквивалентные количества двух или более связывающих функциональных групп.

31. Способ по любому из пп. 27–30, в котором клетки продуцируют больше первой связывающей функциональной группы, чем второй из указанных двух или более связывающих функциональных групп.

32. Клетка, содержащая

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER2;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая вместе с указанной общей легкой цепью образует переменный домен, который связывается с внеклеточным участком HER3; и

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны или не связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в указанной клетке.

33. Контейнер, содержащий нуклеиновую кислоту, представляющую собой

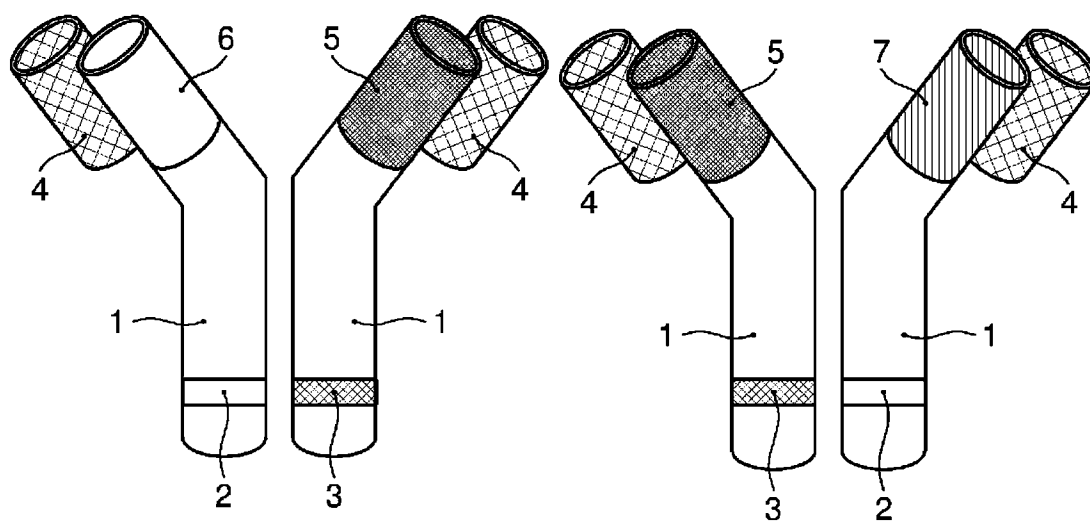
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком EGFR;

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком HER2;

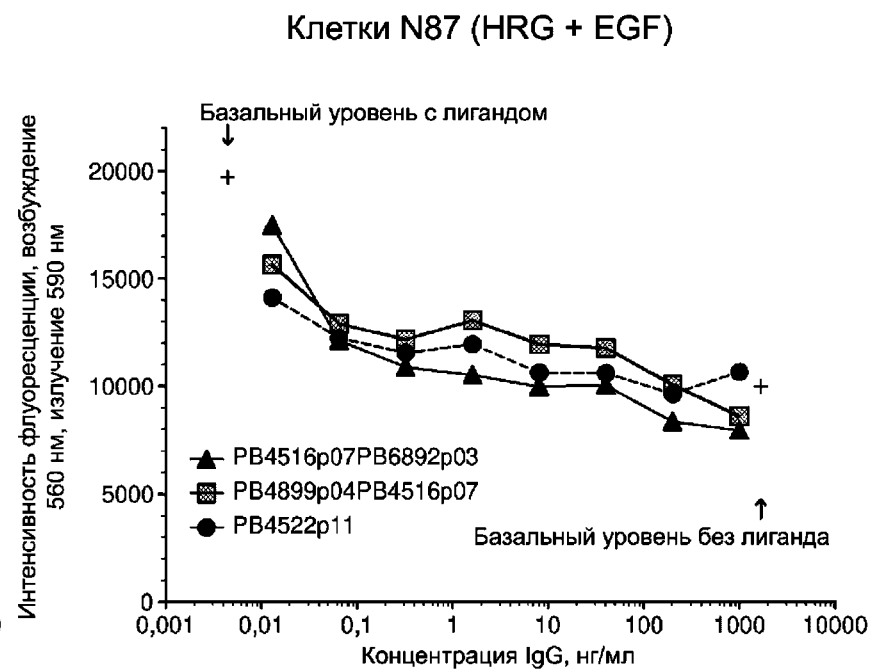
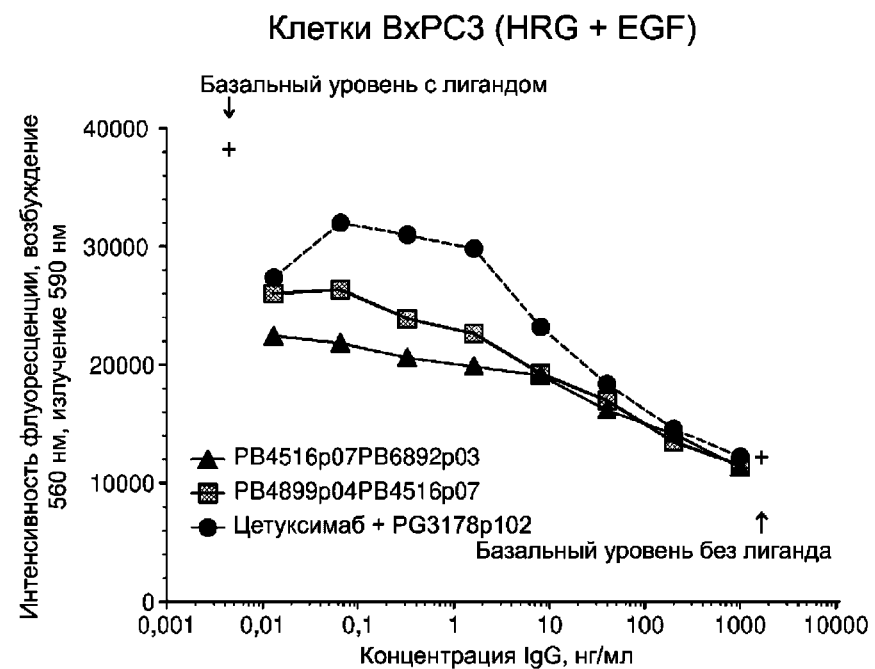
- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий тяжелую цепь, которая способна объединяться в пару с общей легкой цепью с образованием переменного домена, который связывается с внеклеточным участком HER3; и

- нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий указанную общую легкую цепь;

причем необязательно две или более из указанных нуклеиновых кислот могут быть физически связаны, и при этом каждая из указанных нуклеиновых кислот дополнительно содержит последовательность управления экспрессией, позволяющую экспрессировать кодируемые тяжелую и легкую цепи в клетке.

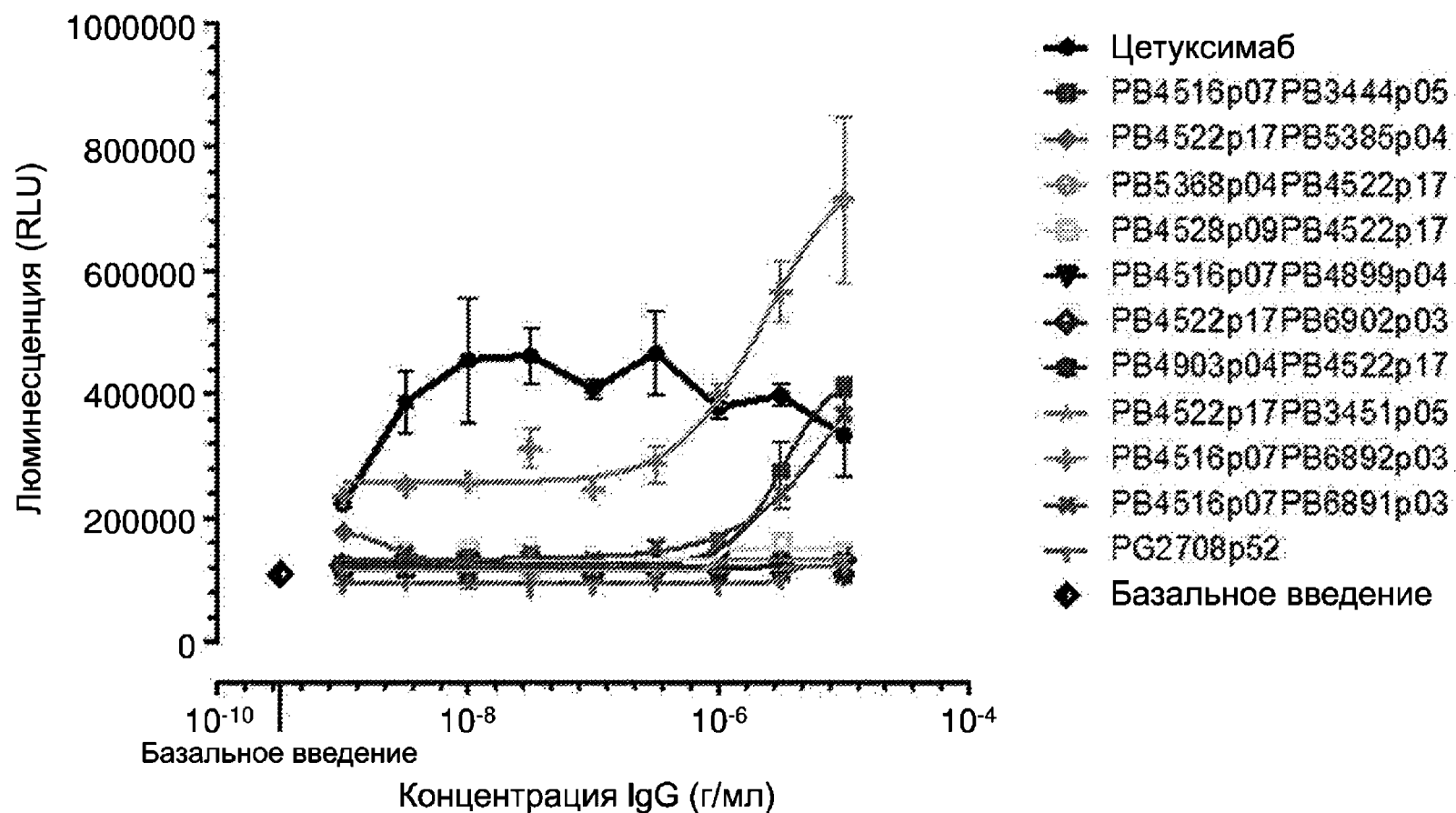


ФИГ. 1



Фиг. 2

Анализ по гену-репортеру ADCC, клетки N87



Фиг. 3

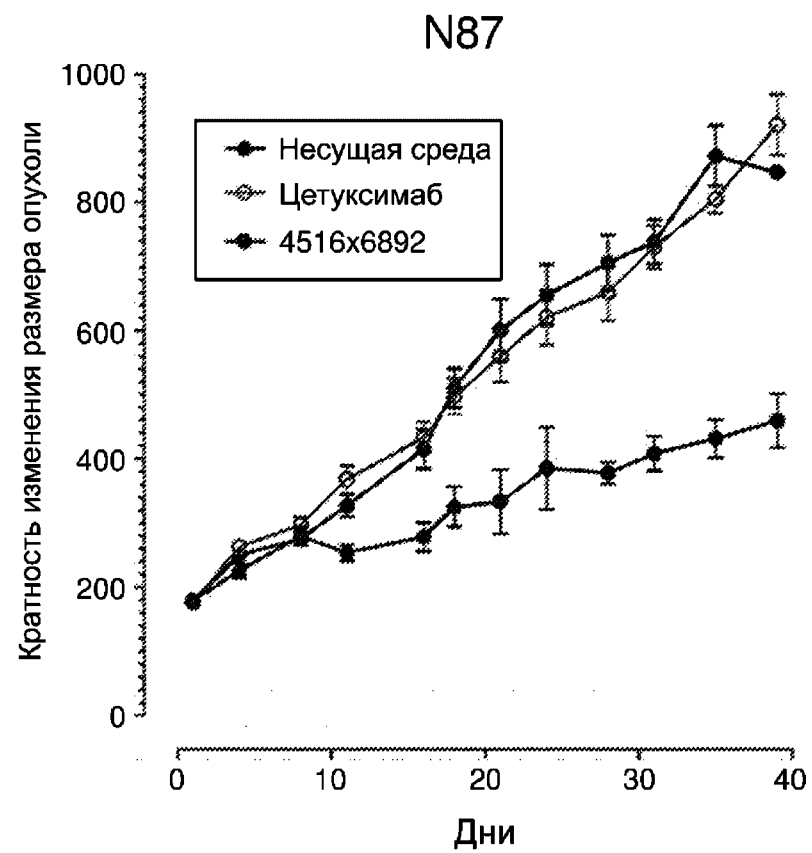
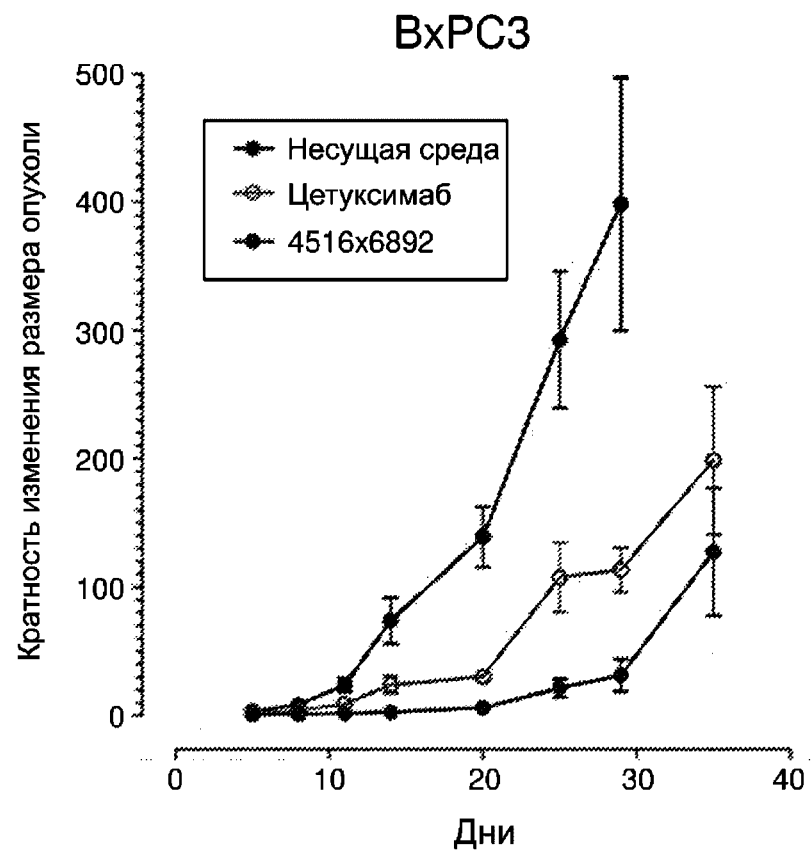
Фиг. 4

А

№	Олигоклональный						ADCC-активность	
	Биспецифическое антитело 1	MF A	MF B	Биспецифическое антитело 2	MF A	MF C	N87	ВхРСЗ
1	PB4522	3178	4280	PB3451	3178	1871		
2	PB4522	4280	3178	PB6902	4280	1871		
3	PB4516	3755	3178	PB6891	3755	1847	++	
4	PB4516	3755	3178	PB6892	3755	1849	+++	
5	PB4528	3178	4003	PB4522	3178	4280		++
6	PB4522	3178	4280	PB5385	3178	4016		
7	PB4516	3755	3178	PB4899	3755	2703		

В

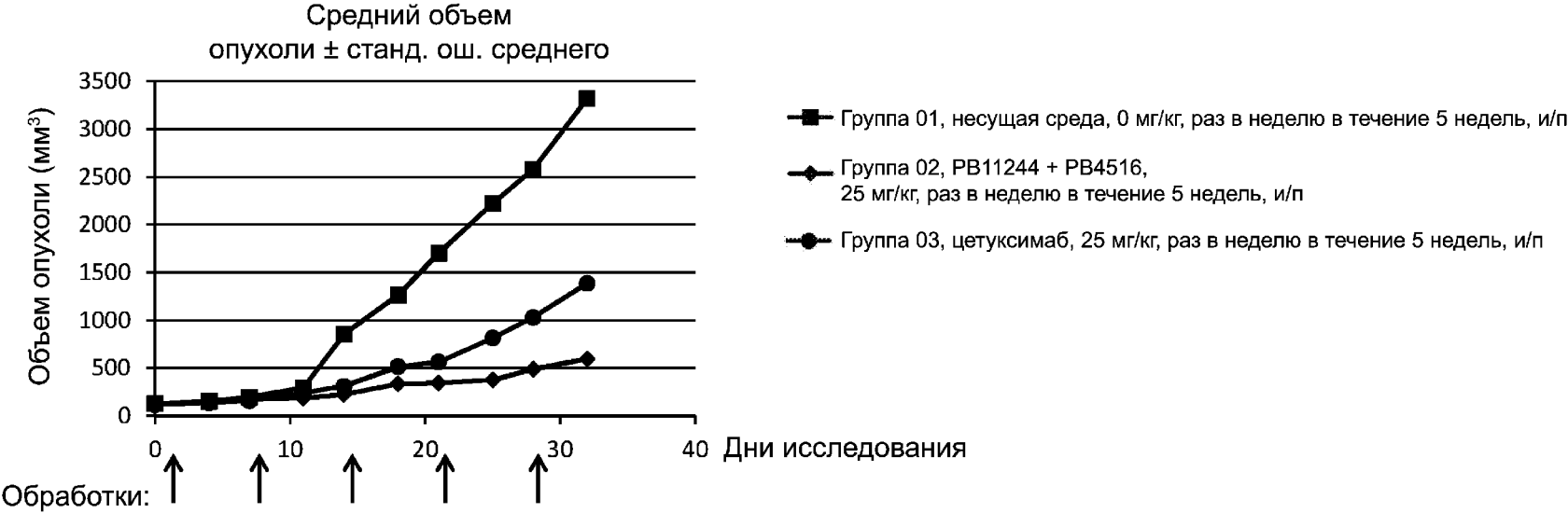
Биспецифическое антитело	MF	MF
PB3444	3178	1847
PB5368	3178	4000
PB4903	2703	4290
PB11244	3755	2032



Фиг. 5

GA0023

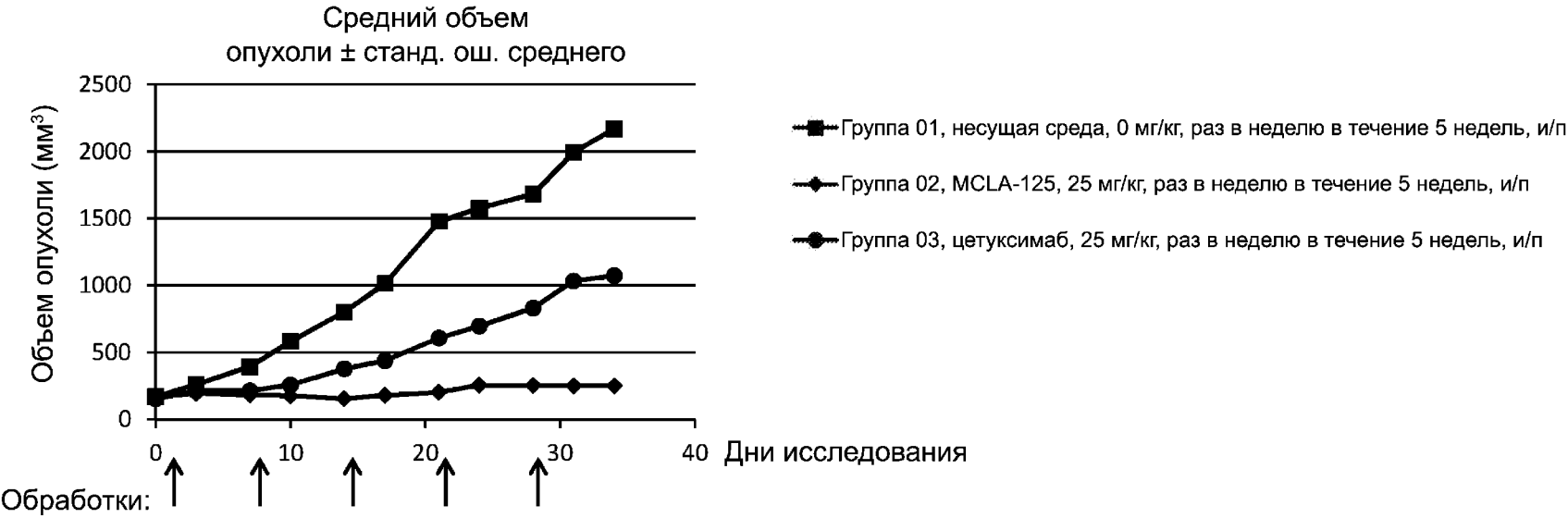
Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
GA0023-P5	4,28	1,18	5,16	1,45	3			Резист.	



Фиг. 6А

LU1206

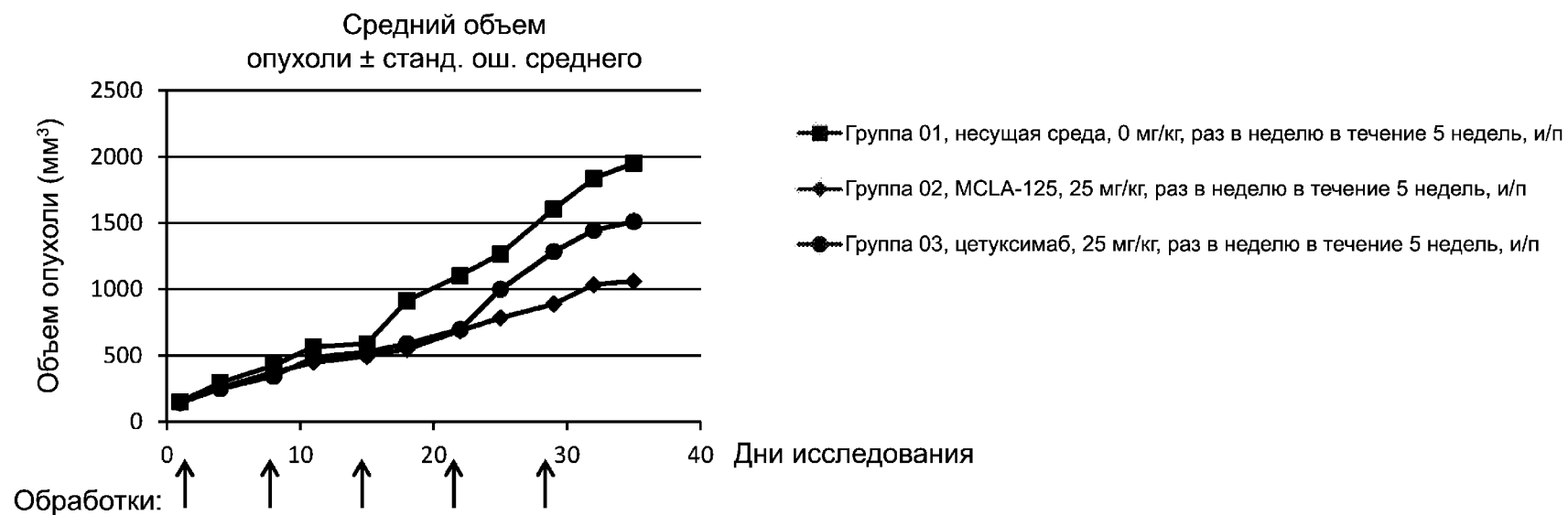
Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
LU1206-P6	4,77	5,95	3,73	-0,11	3		R521K, W477fs	Резист.	



Фиг. 6В

GA0055

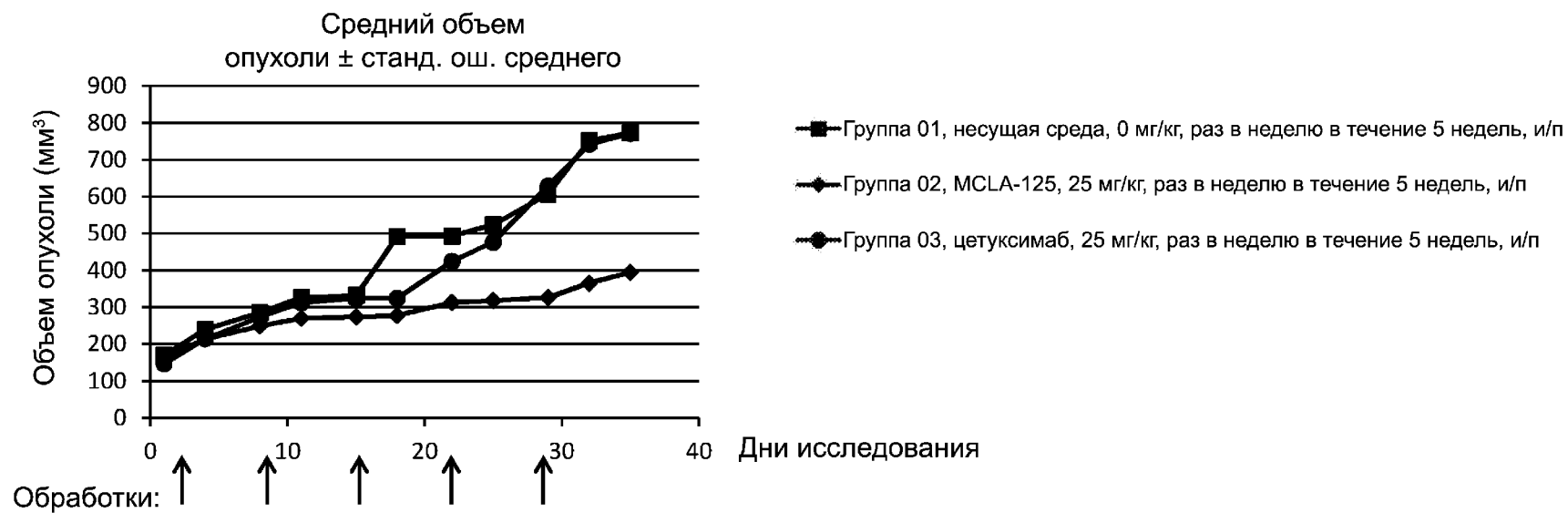
Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
GA0055-P5	7,15	1,64	5,83	-2,57	14		R521K	Резист.	Резист.



Фиг. 6С

LU0009

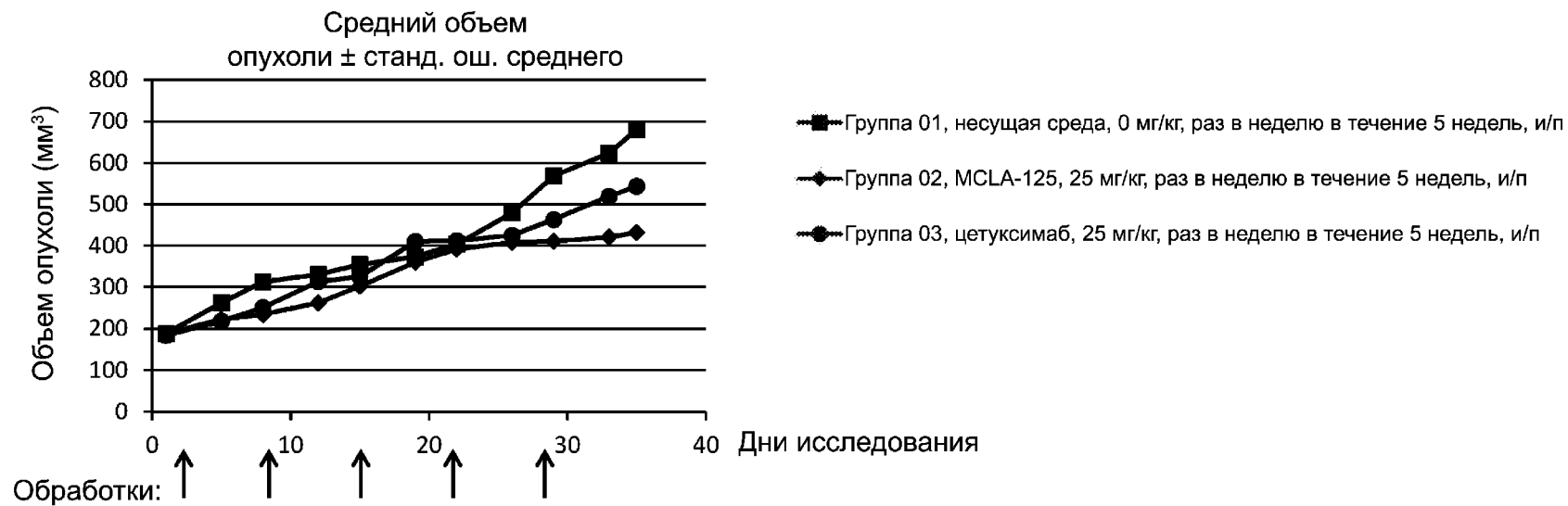
Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
LU0009-P5	3,00	3,15	3,64	2,96	5			Част. чувств.	



Фиг. 6D

ES0026

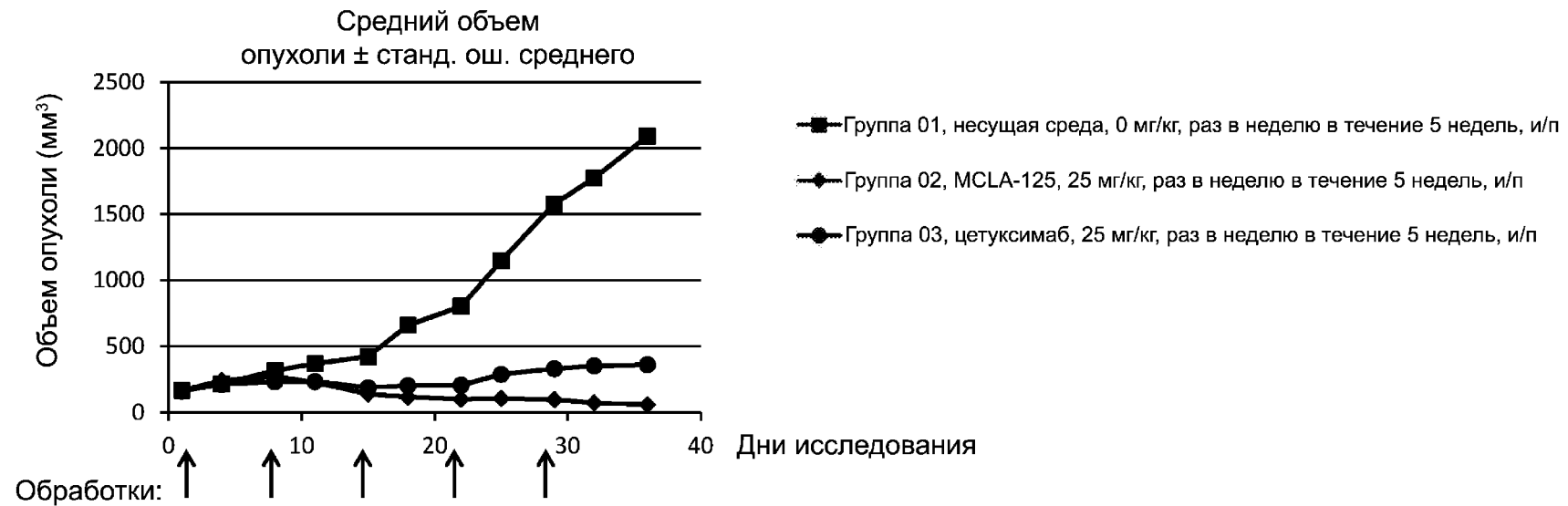
Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
ES0026-P5	4,42	6,63	3,54	2,52	3			Част. чувств.	



Фиг. 6Е

LU0357

Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
LU0357-P6	4,02	3,80	3,66	3,14	2		N528D	Част. чувств.	



Фиг. 6F

GA0006

Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
GA0006-P7	7,93	1,45	4,46	-2,90	14		R521K	Резист.	Резист.



Фиг. 6G

GA0151

Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
GA0151-P6	4,74	2,43	5,27	-2,58	3		R521K	Резист.	



Фиг. 6H

ES0172

Модель PDX	ERBB2	EGFR	ERBB3	NRG1	Число копий ERBB2	Мутация KRAS	Мутация EGFR	Чувствительность цетуксимаба	Чувствительность трастузумаба
ES0172-P6	5,39	3,35	5,08	1,14	4		R521K	Резист.	



Фиг. 6I

Фиг. 7

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи различных переменных доменов, обозначенных MF-номером SEQ ID NO: 1–21, и CDR и переменных областей легкой цепи с SEQ ID NO: 22–27.

ВЫНОСКИ ИЗ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

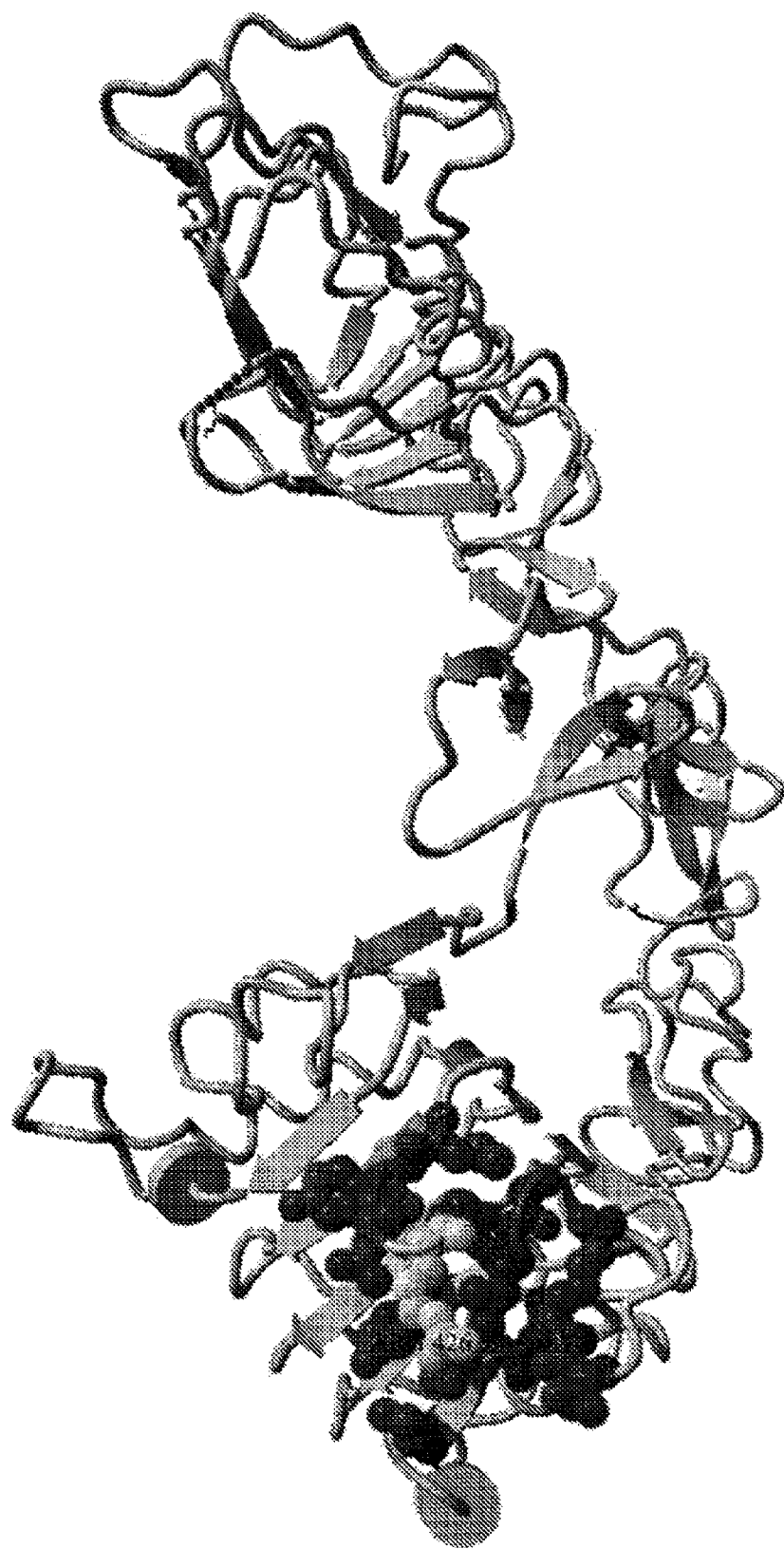
1	HER3-MF3178	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDAVYYCARDEGSRHFWSY WGFDYWGQGITLVTVSS
2	HER2-MF1849	QVQLVESGCGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPCGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMKSLRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYA FDYWGQGITLVTVSS
3	EGFR MF3755	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNWRQAPGHGLEWMGWINAN TGDPTYAQGFTRGVFVSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHF YWGQGITLVTVSS
4	EGFR-MF4280	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHVVRQAPCGLEWMGGFDPE YKTFEFAQNFGGRVTMTEDTSADTAYMELSSLRSEDVAVYYCATEGYYETTTYY YNLFDSWGQGITLVTVSS
5	EGFR-MF4003	QVQLVQSCSELKKPGASVKVSCKASGYTFPSFAMNWRQAPCGLEWMCWITTN TGDPTYAQGFSGRFVSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYNWIRGFDY WGQGITLVTVSS
6	HER2-MF2032	QVQLVESGCGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPCGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMKSLRAEDTAVYYCAKDYYRRTARAC FDYWGQGITLVTVSS

7	VL CDR1	QSISSY
8	VL CDR2	AASSLQS
9	VL CDR3	QSSYSTP
10	IgVκ1-39*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
11	Общая легкая цепь IgKV1*39/jκ1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPPTFGQGTKVEIK
12	Общая легкая цепь IgKV1*39/jκ5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPPTFGQGTREIK

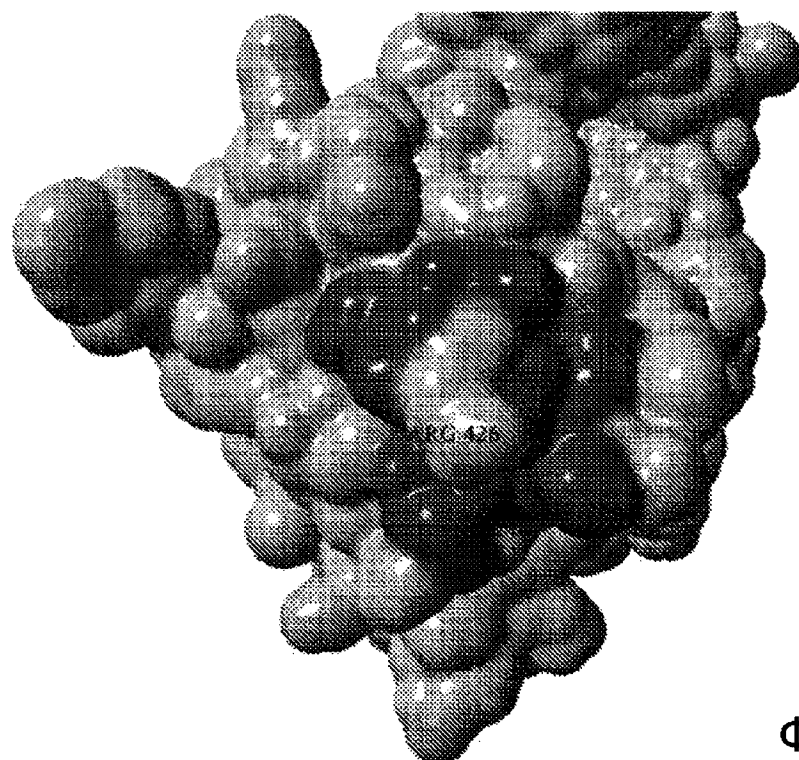
13	IgG1 CH1 Шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNEKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCP
14	IgG1 CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AK
15	IgG1 CH3 KK	GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALENHYTQKSLSLSPGK
16	IgG1 CH3 DE	GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALENHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 8

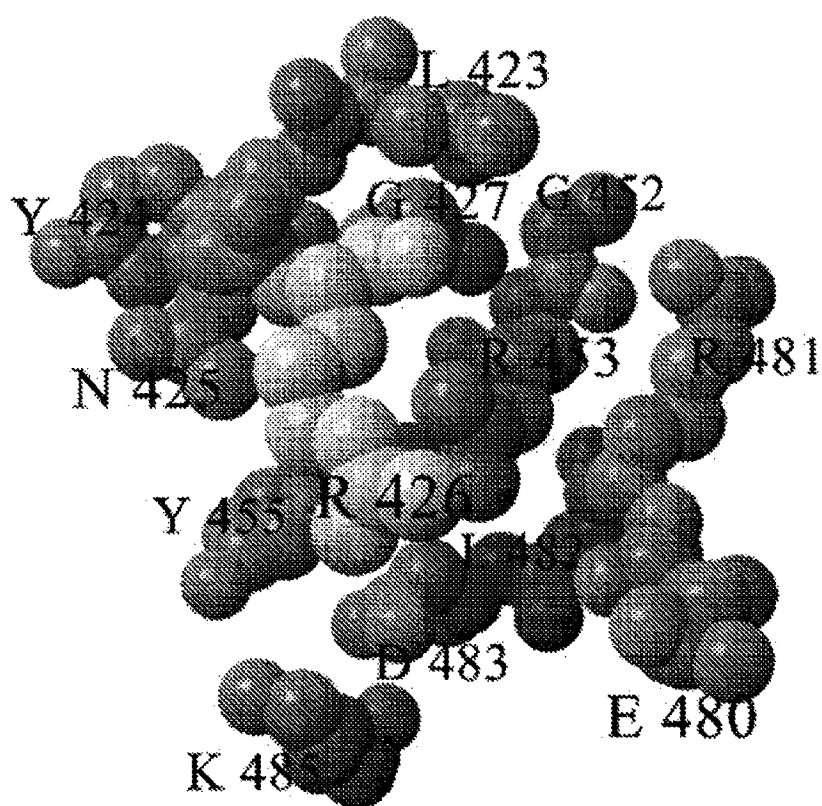
№ MF	Специфичность	Последовательность VH						
3755	EGFR	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNWVRQAPGHGLEWMGWINANTGDPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHFDYWGQGTLLTVSS						
3178	HER3	QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVVRQAPQGQLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDTAVYYCARDHGSRRHFSYWGFDYWGQGTLLTVSS						
1847	HER2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWHPILLGCFDYWGQGTLLTVSS						
1849	HER2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYAFDYWGQGTLLTVSS						
1871	HER2	EVQLVQSCAEVKKPGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAVYYCARGRYDLWYGFQDYWGQGTLLTVSS						
2032	HER2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYRRRTARAGFDYWGQGTLLTVSS						
4280	EGFR	QVQLVQSCARVKKPGASVKVSCKVSQYTI.TFLSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPFYGKTFEFAQNFQGRVTMTFDTSDTAYMFLSSLRSDTAVYYCATFQYFTTTYYNI.FDSWGQGTLLTVSS						
4003	EGFR	QVQLVQSCSELKKPGASVKVSCKASGYTFPSFAMNWLQAPCQGLEWMGWITTTNGDPTYAQGFSGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYNWIRCFDYWGQGTLLTVSS						
4000	EGFR	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNSYSIHVVRQAPGEGLEWVSFISSSSEYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVGAPAFDIWGQGTMTVSS						
4290	EGFR	QMQLVQSCARVKKPGASVKVSCKTSQYTI.TFLSMHWVRQAPGKGFPMGGFEPFYGETTFFAQFQGRVTMTFDTSDTAYMFLSSLRSDTAVYYCATFQYFTTTYYNI.FDYWGQGTLLTVSS						
4016	EGFR	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVAISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEPNYYGSGSPHYFYMDVWGKGTLLTVSS						
2703	HER3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSIVVRQAPGKGLEWVSTFSGSDGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSYSSGWYGFPTDYFDYWGQGTLLTVSS						
2708		EVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHVRQAPGKGLEWVAISYDGSSTKYSDSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKECWSFDSSGYRSWFDSSWGQGTLLTVSS						
1337	Столбнячный анатоксин	EVQLVETCAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPCQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALEVDYWGQGTLLTVSS						
		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3755	EGFR	QVQLVQSCSELKKPGASVKISCKASGYDFT	NYAMN	WVRQAPGHGLEWMG	WINANTGDPTYAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTR	ERFLEWLHFDY	WGQGTLLTVSS
3178	HER3	QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	GYYMH	WVRQAPQGQLEWMG	WINPNSGGTNYAQKFQG	RVTMTDTSISTAYMELSLRSDTAVYYCARDHGSRRHFSYWGFDY		WGQGTLLTVSS
1849	HER2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	GDYGSYSSYAFDY	WGQGTLLTVSS
2032	HER2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	DYRRRTARAGFDY	WGQGTLLTVSS
1337	TT	EVQLVETCAEVKKPGASVKVSCKASDYIFT	KYDIN	WVRQAPQGQLEWMG	WMSANTGNTGYAQKFQG	RVTMTDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCAR	SSLFKTETAPYYHFALEVDY	WGQGTLLTVSS



Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С