

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290192** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.06.03

(22) Дата подачи заявки
2020.08.19

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **ЛЕЧЕНИЕ РАКА КОМБИНАЦИЕЙ АНТИТЕЛА, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТСЯ LGR5 И EGFR, И ИНГИБИТОРА ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I**

(31) **19192327.5**

(32) **2019.08.19**

(33) **EP**

(86) **PCT/NL2020/050517**

(87) **WO 2021/034194 2021.02.25**

(71) Заявитель:

МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Тросби Марк, Вассерман Эрнесто

Айзек (NL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении описаны антитела или их функциональные участки, производные и/или аналоги, которые содержат переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком сопряженного с G-белком рецептора, содержащего богатые лейцином повторы (LGR5), для применения в лечении рака, причем антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог вводят с ингибитором топоизомеразы I.

A1

202290192

202290192

A1

ЛЕЧЕНИЕ РАКА КОМБИНАЦИЕЙ АНТИТЕЛА, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТСЯ LGR5 И EGFR, И ИНГИБИТОРА ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I

Изобретение относится к средствам и способам лечения рака. В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта комбинацией антитела, которое связывается LGR5 и EGFR, и ингибитора топоизомеразы. Изобретение дополнительно относится к комбинации, предназначенной для применения в таких способах, и к комбинации, предназначенной для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака желудочно-кишечного тракта.

10

Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности раком в мире. Несмотря на разработку новых видов лечения КРР, многие из них не смогли успешно пройти клинических испытаний, и метастатический КРР по-прежнему практически неизлечим. Современная стандартная терапия распространенного КРР в клиниках включает в себя схемы химиотерапии, которые блокируют существенные функции в раковых клетках и уничтожают делящиеся клетки.

15

Появляющиеся доказательства указывают на то, что рост рака и возобновление роста после вызванной лечением ремиссии вызваны популяциями раковых стволовых клеток, которые избегают химиотерапевтического лечения. Без ограничений, накладываемых теорией, считается, что поддержание этих стволовых клеток регулируется сигнальным путем WNT.

20

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, считается, что второй онкогенный путь в КРР, который, как считается, отвечает за повышенную пролиферацию раковых клеток и уклонение от апоптоза, представляет собой путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Несколько анти-EGFR лекарственных средств продемонстрировали определенные уровни эффективности при целенаправленной терапии метастатического КРР (мКРР). Однако из-за гетерогенности КРР онкогенные мутации в расположенном ниже по пути гене KRAS придают устойчивость к анти-EGFR-терапии (~ 40% всех пациентов с мКРР), половина пациентов с KRAS дикого типа обладает врожденной резистентностью к анти-EGFR-терапии, и большинство пациентов, которые являются чувствительными к анти-EGFR-терапии, демонстрируют развивающуюся позже резистентность рака.

25

30

В рамках программы антител Biclomics® компания Merus разработала мультиспецифические антитела, которые нацелены на EGFR и сопряженный с G-белком рецептор, содержащий богатые лейцином повторы (LGR5), маркер стволовых клеток в сигнальном пути WNT. Эффективность таких мультиспецифических антител оценивали *in vitro* и *in vivo* с использованием полученных от пациента с КРР органоидов и использованием моделей PDX мышей соответственно. Было показано, что мультиспецифические антитела, которые нацелены на EGFR и LGR5, ингибируют рост опухоли. Было показано, что активность таких ингибирующих антител коррелировала с уровнями экспрессии РНК LGR5 клетками из опухоли.

35

40

Настоящее изобретение показывает, что комбинированная терапия, включающая введение мультиспецифического антитела, нацеленного на EGFR и LGR5, в комбинации с ингибитором топоизомеразы I, является неожиданно эффективной по сравнению с влиянием мультиспецифического антитела или антитела к топоизомеразе по отдельности. Такая комбинированная терапия может препятствовать метастазированию и/или возобновлению роста опухоли после индуцированной лечением ремиссии у пациентов с КРР и обеспечивать более длительную ремиссию.

45

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложено антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, для применения в лечении рака, причем антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог вводят с ингибитором топоизомеразы I. Рак предпочтительно представляет собой колоректальный рак, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта или рак яичника, предпочтительно колоректальный рак. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог и ингибитор топоизомеразы I предпочтительно вводят субъекту одновременно.

В одном аспекте антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог вводят субъекту перед ингибитором топоизомеразы I.

Переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, может содержать аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, как показано на Фиг. 8; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной модификации, включая вставки, делеции, замены или их комбинацию, по сравнению с указанной VH. Переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, может содержать аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, как показано на Фиг. 8; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной модификации, включая вставки, делеции, замены или их комбинацию, по сравнению с указанной VH. Антитело предпочтительно содержит оба указанных переменных домена.

Переменный домен, связывающийся с LGR5, предпочтительно связывается с эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 21–118 последовательности человеческого LGR5, как показано на Фиг. 1. В одном варианте осуществления аминокислотные остатки в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 человеческого LGR5 участвуют в связывании предложенного переменного домена, связывающегося с LGR5, с LGR5. Переменный домен, связывающийся с LGR5, предпочтительно связывается меньше с белком LGR5, содержащим одну или более вариаций аминокислотных остатков, выбранных из 43A, 44A, 46A, 67A, 90A и 91A.

Переменный домен, связывающийся с EGFR, предпочтительно связывается с эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 420–480 последовательности человеческого EGFR, как показано на Фиг. 2. В одном варианте осуществления аминокислотные остатки в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 человеческого EGFR участвуют в связывании предложенного переменного домена, связывающегося с EGFR, с EGFR. Переменный домен, связывающийся с EGFR, предпочтительно связывается меньше с белком EGFR, содержащим одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из I462A, G465A, K489A, I491A, N493A и C499A.

Предложенное антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, как описано в данном документе, предпочтительно содержит переменный домен, связывающийся с LGR5, с характеристикой связывания эпитопов, описанной выше в настоящем документе, так и переменный домен, связывающийся с EGFR, с характеристикой связывания эпитопа, описанной выше в настоящем документе.

В одном варианте осуществления ингибитор топоизомеразы I представляет собой камптотecin или его производное. В другом случае в предпочтительном варианте осуществления ингибитор топоизомеразы I представляет собой иринотекан или топотекан.

Антитело предпочтительно представляет собой ADCC-индуцирующее антитело. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело с улучшенной ADCC. В одном варианте осуществления антитело является афукозилированным.

5

В изобретении также предложен способ ингибирования пролиферации клетки, которая экспрессирует EGFR и LGR5, в системе, допускающей пролиферацию клетки, причем способ включает обеспечение системы с ингибитором топоизомеразы I и антителом или его функциональным участком, производным и/или аналогом, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5.

10

Дополнительно предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту, одновременно или последовательно, ингибитора топоизомеразы I и антитела или его функционального участка, производного и/или аналога, содержащего переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5.

15

Рак предпочтительно представляет собой колоректальный рак, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта или рак яичника. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

20

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; и ингибитор топоизомеразы I. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог и ингибитор топоизомеразы I могут быть обеспечены в одном составе. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог и ингибитор топоизомеразы I также могут быть обеспечены в отдельных составах. При обеспечении в отдельных составах оба лекарственного средства могут быть введены одновременно или последовательно.

25

30

Дополнительно предложен набор, содержащий антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; ингибитор топоизомеразы I и инструкции по применению антитела и ингибитора топоизомеразы I в лечении, как описано в настоящем документе.

35

Дополнительно предложено антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, для применения в лечении рака желудочно-кишечного тракта у субъекта, причем антитело вводят одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором топоизомеразы I.

40

В одном аспекте изобретения предложено антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, причем антитело вводят одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором топоизомеразы I. Лечение предпочтительно направлено в отношении колоректального рака, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта или рака яичника, предпочтительно колоректального рака.

45

50

В данном документе также предложен продукт, содержащий антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, и ингибитор топоизомеразы I, в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении рака желудочно-кишечного тракта у субъекта.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10

Для более полного понимания настоящего описания сначала приведены определения конкретных терминов. Дополнительные определения представлены в подробном описании. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют общепринятое значение, понятное среднему специалисту в данной области, и применяются стандартные способы иммунологии, химии белка, биохимии, рекомбинантной ДНК и фармакологии.

15

При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Применение термина «включая», а также других форм, например «включают», «включает» и «включал», не имеет ограничительного характера.

20

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 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 предпочтительно имеют максимально возможное сходство с естественными антителами подлежащего лечению субъекта (например, с человеческими антителами, если субъектами являются люди). Антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным форматом или способом получения.

25

30

«Биспецифическое антитело» представляет собой антитело, описанное в настоящем документе, в котором один домен антитела связывается с первым антигеном, а второй 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. Термин дополнительно включает антитела, в которых VH способна специфически распознавать первый антиген, а VL, попарно соединенная 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.

35

40

45

Используемый в настоящем документе термин «общая легкая цепь» относится к двум легким цепям (или VL участкам) в биспецифическом антителе. Две легкие цепи (или VL участки) могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, которые не приводят к изменению специфичности связывания полноразмерного антитела. Термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одиночная легкая цепь»,

50

«одиночная VL» с добавлением или без добавления термина «перестроенная» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Термин «общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотные последовательности которых не являются идентичными. Существуют множество вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, вставки и/или добавления), которые не 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, в рамках объема определения общих легких цепей, используемого в настоящем документе, 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. Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с изобретением означает содержание по существу полного IgG, но при этом необязательно со 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 переменную (V) области, которые могут быть разделены на домены, обозначаемые CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Антитело IgG связывается с антигеном посредством доменов переменной 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. Полноразмерные IgG не должны иметь делеций существенных участков любой из областей. Однако молекулы IgG, в которых удален один или несколько аминокислотных остатков, без существенного изменения характеристик связывания полученной молекулы IgG, входят в объем термина «полноразмерные IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно в областях, отличных от CDR, причем удаленные аминокислоты не являются обязательными для антигенной специфичности связывания IgG.

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 последовательностей для сравнения нуклеотидных последовательностей определяют с помощью приложения AlignX к программному обеспечению Vector NTI Advance[®] 11.5.2, 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(22): 4673–4680), матрица вкладов swgapdnamt, штраф за открытие гэпа равен 15, а штраф за удлинение гэпа равен 6,66. Аминокислотные последовательности выравнивают с применением приложения AlignX к программному обеспечению Vector NTI Advance[®] 11.5.2 с использованием настроек по умолчанию, в которых задействованы модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., (1994) *Nuc. Acids Res.* 22(22): 4673–4680), матрица вкладов blosum62mt2, штраф за открытие гэпа равен 10, а штраф за удлинение гэпа равен 0,1.

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 или LGR5, могут также распознавать другие соединения, если такие другие соединения содержат эпитоп аналогичного типа. Таким образом, термины «специфически распознает» в отношении взаимодействия антигена

и антитела не исключают связывания антител с другими соединениями, которые содержат эпитоп аналогичного типа.

5 Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» означают участок на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка (так называемые линейные и конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные из смежных линейных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как конформация эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может обычно включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов известны специалистам в данной области и включают методики, известные в данной области, например, рентгеновскую кристаллографию, HDX-MS и двухмерный ядерный магнитный резонанс, Pepscan и аланиновое сканирование в зависимости от природы эпитопа (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

20 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).

25 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 прогрессирования, развития, ухудшения или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

30 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. Под благоприятным эффектом может пониматься улучшение относительно исходного уровня, включая улучшение по сравнению с измерением или наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии со способом. Например, под благоприятным эффектом могут пониматься замедление, стабилизация, остановка или изменение направления развития рака у субъекта на любой клинической стадии, с подтверждением по снижению или устранению 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.

45 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 рецидива опухоли. Эффективное количество можно вводить за одну или более процедур введения. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) подавлять, задерживать, в некоторой степени замедлять и, возможно, останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) подавлять метастазирование опухоли; (v) подавлять рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) в некоторой степени ослаблять один или более симптомов, связанных с раком. В одном примере «эффективное количество» представляет собой количество антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора топоизомеразы I в комбинации, которое индуцирует уменьшение рака (например, уменьшение количества раковых клеток); замедление прогрессирования рака или предотвращение возобновления роста или рецидива рака, причем рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта, предпочтительно колоректальный рак.

В изобретении дополнительно предложен способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей EGFR и экспрессирующей LGR5 в системе, допускающей рост клетки, причем способ включает обеспечение системы с антителом и ингибитором топоизомеразы I, как описано в настоящем документе. Система предпочтительно представляет собой культуральную систему. Способ предпочтительно включает культивирование указанной клетки в указанной системе. Ингибирование предпочтительно представляет собой уменьшение количества клеток, объема опухоли или размера опухоли по меньшей мере на 10% по сравнению с количеством клеток, объемом опухоли или размером опухоли, в аналогичных по прочим параметрам условиях, за исключением присутствия антитела и/или ингибитора топоизомеразы I настоящего изобретения. Ингибирование предпочтительно представляет собой уменьшение количества клеток, объема опухоли или размера опухоли по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% и/или повышение выживаемости без прогрессирования заболевания. Ингибирование может также представлять собой снижение по меньшей мере на 10% других параметров, связанных с малигнизацией опухоли или дисплазией, таких как количество просветов в органоиде, по сравнению с количеством просветов, полученным в условиях, которые аналогичны по иным параметрам, за исключением присутствия антитела и/или ингибитора топоизомеразы I изобретения. Ингибирование предпочтительно представляет собой уменьшение количества просветов в органоиде по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% и/или повышение выживаемости без прогрессирования заболевания.

Во избежание сомнений следует уточнить, что термин «рост клеток» в настоящем документе относится к изменению количества клеток. Ингибирование роста означает уменьшение количества клеток, которое в противном случае было бы получено в аналогичных по прочим параметрам условиях, за исключением присутствия антитела и/или ингибитора топоизомеразы I по настоящему изобретению. Ускорение роста означает увеличение количества клеток, которое было бы получено в ином случае. Фраза «рост клеток», как правило, относится к пролиферации клеток. Уменьшение сравнивают с ростом/пролиферацией этой же клетки в условиях, которые идентичны по иным параметрам, но в отсутствие антитела и/или ингибитора топоизомеразы I изобретения.

В изобретении также предложен способ лечения индивида, имеющего рак желудочно-кишечного тракта или риск развития указанного рака, причем способ включает введение антитела изобретения нуждающемуся в этом индивиду. Индивид предпочтительно представляет собой индивида, имеющего рак. Рак предпочтительно представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

В изобретении также предложен способ профилактики метастазирования или рецидива опухоли у индивида, который имеет рак, предпочтительно рак желудочно-кишечного тракта или подвержен риску появления указанного рака, причем способ включает введение антитела или его функционального участка, производного и/или аналога, который содержит переменный домен,

связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и вариабельный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, а также ингибитора топоизомеразы I нуждающемуся в этом индивиду. Индивид предпочтительно представляет собой индивида, который имеет рак или, в случае рецидива опухоли, индивида с рентгенографическим диагнозом рецидива или признаками и симптомами рецидива рака после периода улучшения или ответа. Рак предпочтительно представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

Профилактика метастазирования в предпочтительном варианте осуществления представляет собой предотвращение метастазирования рака желудочно-кишечного тракта до нежелудочно-кишечного рака, такого как метастазы в ткани легкого или печени.

Эффективное количество комбинированной терапии вводят в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, в рамках «эффективной схемы», которая относится к комбинации антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора топоизомеразы I, причем порядок введения и частота дозирования приемлемы для осуществления лечения.

Как указано выше, такие типы рака, как KPP, могут быть связаны с наличием онкогенных мутаций, например присутствующих в генах, кодирующих каталитическую субъединицу альфа фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PIK3CA) или Kirsten RAт Sarcoma (KRAS). Мутации в обоих генах PIK3CA и KRAS широко вовлечены в такие типы рака, как колоректальный рак. Распространенность мутаций KRAS и PIK3C при метастатическом KPP составляет от 20 до 50% для различных этнических популяций и до 14,3% соответственно, в то время как мутация PIK3CA C420R была обнаружена по меньшей мере при девяти различных типах рака, включая карциному молочной железы, колоректальную аденокарциному, карциному пищевода, глиому головного мозга низкой степени злокачественности, плоскоклеточную карциному легкого, новообразование тела матки, аденокарциному предстательной железы, аденокарциному желудка, новообразование яичников (Prevalence of KRAS, BRAF, PI3K and EGFR mutations among Asian patients with metastatic colorectal cancer, Phua et al., *Oncology Letters*, 10:2519–2526 2014; the AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7(8):818–831. Dataset Version 4; <https://www.cancer.gov/research/key-initiatives/ras/ras-central/blog/2017/pik3ca.pdf>). К июлю 2019 г. в каталоге соматических мутаций при раке (COSMIC), размещенном Sanger Institute, Великобритания, показаны 18 различных типов тканей, несущих мутацию PIK3C C420R (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, № мутации COSM757). В мутации в PIK3CA C420R цистеин заменен на аргинин в положении аминокислотного остатка 420 белка, а в мутации KRAS G12D остаток глицина в положении 12 (G) KRAS мутирован в аспарагиновую кислоту (D).

Одно преимущество настоящего изобретения заключается в том, что субъекты, имеющие мутацию KRAS и/или PIK3CA, прошедшие комбинированное лечение антителом, которое связывается с LGR5 и EGFR, и ингибитором топоизомеразы I, не демонстрировали значительного снижения массы тела на протяжении всего введения. В частности, субъекты, имеющие мутации KRAS G12D и/или PIK3CA C420R не демонстрировали статистически значимого снижения массы тела.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъектов, имеющих мутацию в гене, кодирующем KRAS, предпочтительно мутацию, приводящую к замене G12D, и/или мутацию в гене, кодирующем PIK3CA, предпочтительно мутацию, приводящую к замене C420R.

Рак, который подразумевают в способе или продукте для применения в лечении, описанном в данном документе, предпочтительно представляет собой карциному молочной железы,

колоректальную аденокарциному, карциному пищевода, глиому головного мозга, предпочтительно глиому головного мозга низкой степени злокачественности, плоскоклеточную карциному легкого, новообразование тела матки, аденокарциному предстательной железы, аденокарциному желудка или новообразование яичников. Рак предпочтительно представляет собой колоректальный рак, рак легких, рак желудочно-кишечного тракта или рак яичника, предпочтительно колоректальный рак. Рак предпочтительно имеет мутацию в гене, кодирующем KRAS, гене, кодирующим PIK3CA, или их комбинацию. Мутация KRAS предпочтительно представляет собой мутацию, приводящую к замене аминокислоты G12D. Мутация PIK3CA предпочтительно представляет собой мутацию, приводящую к замене аминокислоты C420R.

10 Дополнительным преимуществом настоящего изобретения является отсутствие явных признаков токсичности комбинированного лечения антителом, связывающимся с LGR5 и EGFR, и ингибитором топоизомеразы I, которое регистрировали у субъектов, имеющих мутацию KRAS и/или PIK3CA, в частности, у субъектов с мутацией KRAS G12D и/или мутацией PIK3CA C420R.

15 При использовании в настоящем документе термины «синергия», «терапевтическая синергия» и «синергетический эффект» относятся к явлению, при котором лечение пациентов комбинацией терапевтических агентов (например, антителом к EGFR/LGR5 в комбинации с ингибитором топоизомеразы I) приводит к терапевтически лучшему результату по сравнению с результатом, полученным при использовании каждого компонента комбинации по отдельности (см., например, T. H. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187). В этом контексте терапевтически лучший результат включает одно или более из следующего: (а) увеличение терапевтического ответа, превышающего любой или оба из отдельных эффектов каждого агента отдельно в той же дозе, что и в комбинации; (б) снижение дозы одного или более агентов в комбинации без снижения терапевтической эффективности; (в) снижение частоты возникновения неблагоприятных явлений с одновременным достижением терапевтического благоприятного эффекта, равного или превышающего таковой при монотерапии каждым агентом в той же дозе, что и в комбинации; (д) снижение ограничивающей дозу токсичности с одновременным достижением терапевтического благоприятного эффекта, превышающего таковой при монотерапии каждым агентом; (е) задержка или сведение к минимуму индукции резистентности к лекарственному средству. В моделях ксенотрансплантата комбинация, применяемая в максимальной переносимой дозе, в которой каждый из компонентов будет присутствовать в дозе, по существу не превышающей его индивидуальную максимальную переносимую дозу, проявляет терапевтическую синергию, т. е. уменьшение роста опухоли, достигаемое при введении комбинации, превышает значение уменьшения роста опухоли, достигаемое наилучшим компонентом при его отдельном использовании. Синергизм комбинации лекарственных средств можно определить, например, в соответствии с теоремой показателя аддитивности (CI) Чоу-Талалай (Chou et al., Adv. Enzyme Regul. 1984; 22:27–55; Chou, Cancer Res. 2010;70(2):440–446).

40 Используемые в настоящем документе термины «рецидив», или «повторное возникновение», или «повторное развитие» применяются взаимозаменяемо и относятся к рентгенографическому подтверждению возобновления или признакам и симптомам возобновления рака после периода улучшения или ответа на лечение.

45 Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химические соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомеразы I и II). Топоизомеразы представляют собой тип фермента, который контролирует изменения структуры ДНК, катализируя разрыв и повторное соединение фосфодиэфирного каркаса ДНК-цепей в ходе нормального клеточного цикла.

50 Топоизомеразы человека стали мишенями при химиотерапевтическом лечении рака. Без ограничений, накладываемых теорией, считается, что ингибиторы топоизомеразы генерируют одноцепочечные и двуцепочечные разрывы в геноме клетки, что влияет на стабильность генома в клетках. Введение таких разрывов может приводить к апоптозу и гибели клеток.

В настоящем изобретении ингибитор топоизомеразы человека предпочтительно представляет собой ингибитор топоизомеразы I человека. Не имеющим ограничительного характера примером такого ингибитора топоизомеразы является камптотецин (СРТ). СРТ, как давно известно, имеет противораковые свойства. СРТ имеет относительно низкую растворимость. Обнаружены производные СРТ с более высокой активностью. Производные/аналоги СРТ были одобрены и используются в современной химиотерапии рака. Примеры подходящих ингибиторов топоизомеразы I у людей представляют собой камптотецин, топотекан, ламеллярин D и иринотекан. В одном варианте осуществления изобретения термин «ингибитор топоизомеразы I», используемый в данном документе, включает, без ограничений, топотекан, иринотекан, гиматекан, камптотецин и его аналоги, 9-нитрокамптол экин и макромолекулярный конъюгат камптотецина PNU-166148 (соединение A1 в публикации WO 99/17804).

Иринотекан (СРТ-11), полусинтетическое производное камптотецина, представляет собой ингибитор топоизомеразы-I, который активен в отношении различных солидных опухолей, включая колоректальный рак, рак легкого, рак желудка и рак яичника. Иринотекан представляет собой пролекарство, которое гидролизует карбоксилэстеразой печени с получением активного метаболита SN-38. SN-38 элиминируется посредством глюкуронидации, для чего необходимы ферменты УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1, A1 (UGT1A1). Было обнаружено, что генотип UGT1A1*28 ассоциирован с пониженным уровнем глюкуронидации SN-38. Приблизительно 10% североамериканцев имеют 2 копии аллеля UGT1A1*28 (гомозиготные, UGT1A1 *28/*28), и у них с большей вероятностью развиваются нейтропении после терапии иринотеканом (Dean L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. 2015 [Updated 2018 Apr 4], Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, et al., editors. Medical Genetics Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012; Доступно по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294473/>). Субъектов можно подвергнуть скринингу на наличие одного или более аллелей UGT1A1*28. Предпочтительно, чтобы субъект, которому вводят иринотекан, не имел одного или более аллелей UGT1A1*28, более предпочтительно, чтобы указанный субъект не являлся гомозиготным по аллелю UGT1A1*28.

Иринотекан и другие ингибиторы топоизомеразы человека используют в клинической практике в течение довольно долгого времени, и соответствующая информация о дозировках доступна специалисту в данной области. Например, иринотекан можно вводить в дозах 70–350 мг/м² еженедельно, раз в две недели, каждые три недели. В других схемах вводят 120–150 мг/м² на 1 день и 8 день каждые три недели. Другие схемы включают 125 мг/м² в течение 4 недель с последующим двухнедельным интервалом. 50 мг/м² в 1–5 дни каждые три недели и 20 мг/м² в 1–5 дни в 1, 2, 4 и 5 недели. Введение, описанное в настоящем документе, относится к количеству (в мг) на площадь поверхности тела (в м²) субъекта на указанный момент времени.

Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, как описано в данном документе, содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком рецептора эпидермального фактора роста (EGF), и переменный домен, связывающийся с LGR5. EGFR предпочтительно представляет собой человеческий EGFR. LGR5 предпочтительно представляет собой человеческий LGR5. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, как описано в данном документе, содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком человеческого рецептора эпидермального фактора роста (EGF), и переменный домен, связывающийся с человеческим LGR5.

Рецептор (EGFR, ErbB1 или HER1) эпидермального фактора роста (EGF) представляет собой член семейства, состоящего из четырех рецепторных тирозинкиназ (RTK), а именно Her- или cErbB-1, -2, -3 и -4. EGFR также известен под различными синонимами, наиболее распространенным из которых является EGFR. EGFR имеет внеклеточный домен (ECD), который состоит из четырех субдоменов, два из которых участвуют в связывании лиганда, а еще два

участвуют в гомодимеризации и гетеродимеризации. EGFR объединяет внеклеточные сигналы от разнообразных лигандов для получения различных внутриклеточных ответов. Основной путь передачи сигнала, активируемый EGFR, состоит из митогенного сигнального каскада Ras-митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Активация этого пути инициируется привлечением Grb2 к тирозин-фосфорилированному EGFR. Это приводит к активации Ras посредством Grb2-связанного Ras-фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Son of Sevenless (SOS). Кроме того, сигнальный путь PI3-киназа-Akt также активируется EGFR, хотя эта активация гораздо сильнее при наличии коэкспрессии ErbB-3 (HER3). EGFR участвует в развитии нескольких человеческих эпителиальных злокачественных опухолей, в особенности рака молочной железы, мочевого пузыря, немелкоклеточного рака легкого, рака толстой кишки, яичника, головы и шеи и головного мозга. Обнаружены активирующие мутации в гене, а также сверхэкспрессия рецептора и его лигандов, благодаря которым появляются аутокринные активационные петли. Таким образом, данную RTK широко используют в качестве мишени в терапии рака. Разработаны как низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на RTK, так и моноклональные антитела (mAb), направленные на внеклеточные лиганд-связывающие домены, которые к настоящему времени продемонстрировали несколько положительных клинических результатов, хотя и в основном для выбранной группы пациентов. Учетный номер в базе данных человеческого белка EGFR и кодирующего его гена: GenBank NM_005228.3. Данный учетный номер присвоен 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 кодирующем гене, например, возникающей при некоторых раковых заболеваниях или т. п. В настоящем документе используются выражения «рак» и «опухоль», которые, как правило, оба относятся к раку, если конкретно не указано иное.

При упоминании в настоящем документе EGFR подразумевается человеческий EGFR, если не указано иное. Антигенсвязывающий сайт варибельного домена, связывающегося с EGFR, связывается с EGFR и множеством его вариантов, таких как экспрессируемые на некоторых EGFR положительных опухолях.

Термин LGR относится к семейству белков, известных как сопряженные с G-белком рецепторы, содержащие богатые лейцином повторы. Известно, что несколько членов семейства участвуют в сигнальном пути WNT; наиболее известными из них являются LGR4; LGR5 и LGR6.

LGR5 представляет собой содержащий богатые лейцином повторы сопряженный с G-белком рецептор 5; Альтернативные названия для гена или белка: сопряженный с G-белком рецептор 5, содержащий богатые лейцином повторы; сопряженный с G-белком рецептор 5, содержащий богатые лейцином повторы; сопряженный с G-белком рецептор HG38; сопряженный с G-белком рецептор 49; сопряженный с G-белком рецептор 67; GPR67; GPR49; орфанный сопряженный с G-белком рецептор HG38; сопряженный с G-белком рецептор 49; GPR49; HG38 и FEX. Белок или антитело изобретения, связывающиеся с LGR5, связываются с человеческим LGR5. LGR5-связывающий белок или антитело изобретения в связи со сходством последовательности и третичной структуры между ортологами человека и млекопитающего может также связываться с таким ортологом, но это не обязательно. Учетные номера в базе данных человеческого белка LGR5 и кодирующего его гена: (NC_000012.12; NT_029419.13; NC_018923.2; NP_001264155.1; NP_001264156.1; NP_003658.1). Учетные номера присвоены главным образом для получения дополнительного способа идентификации LGR5 в качестве мишени, причем фактическая последовательность связанного белка LGR5 может изменяться, например, в результате мутации в кодирующем гене, например возникающей при некоторых раковых заболеваниях или т. п. Антигенсвязывающий сайт LGR5 связывается с LGR5 и различными его вариантами, такими как экспрессируемые некоторыми LGR5 положительными опухолевыми клетками

В контексте настоящего изобретения указанная клетка экспрессирует LGR5, если клетка содержит детектируемую РНК, которая кодирует LGR5. Экспрессию часто также можно

обнаружить путем инкубации клетки с антителом, которое связывается с LGR5. Однако некоторые клетки не имеют достаточно высокой экспрессии белка для такого обнаружения антителом к LGR5. В таких случаях предпочтительной является мРНК или другие формы обнаружения нуклеиновой последовательности.

5

Если в настоящем документе указаны учетные номера или альтернативные названия белков/генов, они указаны главным образом для получения дополнительного способа идентификации упомянутого белка в качестве мишени, причем фактическая последовательность белка, связанного с антителом изобретения, может изменяться, например, в результате мутации и/или альтернативного сплайсинга в кодирующем гене, например, возникающих при некоторых раковых заболеваниях или т. п. Целевой белок связан антителом при условии, что эпитоп присутствует в белке, а эпитоп доступен для антитела.

10

Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, как описано в данном документе, предпочтительно мешает связыванию лиганда с EGFR с EGFR. Используемый в настоящем документе термин «мешает связыванию» означает, что связывание антитела или его функционального участка, производного и/или аналога с EGFR конкурирует с лигандом за связывание с рецептором EGF. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог может уменьшать связывание лиганда, вытеснять лиганд, уже связанный с рецептором EGF, или он может, например, посредством стерического затруднения, по меньшей мере частично предотвращать связывание лиганда с рецептором EGF.

15

20

Антитело к EGFR изобретения предпочтительно ингибирует индуцированную лигандом EGFR сигнализацию, измеренную по индуцированному лигандом росту клеток ВхРС3 (ATCC CRL-1687) или клеток ВхРС3-luc2 (Perkin Elmer 125058) или индуцированной лигандом гибели клеток А431 (ATCC CRL-1555). Упомянутое антитело к EGFR может снижать индуцированную лигандом сигнализацию по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, предпочтительно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, более предпочтительно на 70%, 80%, 85% и наиболее предпочтительно на 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с индуцированным лигандом эффектом в присутствии нейтрального вещества или отрицательного контроля при измерении в анализе, известном в данной области. EGFR может связываться с рядом лигандов и стимулировать рост упомянутых клеток ВхРС3 или клеток ВхРС3-luc2. В присутствии лиганда EGFR происходит стимуляция роста клеток ВхРС3 или ВхРС3-luc2. Рост клеток ВхРС3, индуцированный лигандом EGFR, можно измерить путем сравнения роста клеток в присутствии лиганда и без него. Предпочтительным лигандом EGFR для измерения роста клеток ВхРС3 или ВхРС3-luc2, индуцированного лигандом EGFR, является EGF. Индуцированный лигандом рост предпочтительно измеряют с использованием насыщающих количеств лиганда. В предпочтительном варианте осуществления EGF используют в количестве 100 нг/мл культуральной среды. EGF предпочтительно представляет собой EGF от R&D systems, кат. № 396-HB и 236-EG (см. также публикацию WO 2017/069628; полностью включенную в настоящий документ путем ссылки).

25

30

35

40

Антитело к EGFR изобретения предпочтительно ингибирует рост клеток ВхРС3 (ATCC CRL-1687) или клеток ВхРС3-luc2 (Perkin Elmer 125058), индуцированный лигандом EGFR. Упомянутое антитело к EGFR может снижать индуцированную лигандом сигнализацию, стимулирующую рост клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, предпочтительно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, более предпочтительно на 70%, 80%, 85% и наиболее предпочтительно на 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с индуцированным лигандом ростом, стимулированным нейтральным веществом или отрицательным контролем, при измерении в анализе, известном в данной области. EGFR может связываться с рядом лигандов и стимулировать рост упомянутых клеток ВхРС3 или клеток ВхРС3-luc2. В присутствии лиганда происходит стимуляция роста клеток ВхРС3 или ВхРС3-luc2. Рост клеток ВхРС3, индуцированный лигандом

50

EGFR, можно измерить путем сравнения роста клеток в присутствии лиганда и без него. Предпочтительным лигандом EGFR для измерения роста клеток ВхРС3 или ВхРС3-luc2, индуцированного лигандом EGFR, является EGF. Индуцированный лигандом рост предпочтительно измеряют с использованием насыщающих количеств лиганда. В 5 предпочтительном варианте осуществления EGF используют в количестве 100 нг/мл культуральной среды. EGF предпочтительно представляет собой EGF от R&D systems, кат. № 396-НВ и 236-EG (см. также публикацию WO 2017/069628; полностью включенную в настоящий документ путем ссылки).

10 Ингибирует ли антитело изобретения в мультиспецифическом формате сигнализацию или рост, предпочтительно определяют способом, описанным выше в настоящем документе, с использованием моноспецифического одновалентного или моноспецифического двухвалентного варианта антитела. Такое антитело предпочтительно имеет сайты связывания с рецептором, сигнализацию которого необходимо определить. Моноспецифическое одновалентное антитело 15 может иметь переменный домен с нерелевантной специфичностью связывания, такой как специфичность к столбнячному анатоксину. Предпочтительным антителом является двухвалентное моноспецифическое антитело, антигенсвязывающие переменные домены которого состоят из переменных доменов, которые связываются с членом семейства рецепторов EGF.

20 Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, как описано в данном документе, содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5.

25 Вариательный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, предпочтительно связывается с эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 21–118 последовательности, показанной на Фиг. 1, из которых аминокислотные остатки D43; G44, M46, F67, R90 и F91 участвуют в связывании антитела с эпитопом.

30 Вариательный домен к LGR5 предпочтительно представляет собой переменный домен, причем одна или более замен аминокислотных остатков в LGR5 D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A уменьшает связывание переменного домена с LGR5.

35 Эпитоп на внеклеточном участке LGR5 предпочтительно расположен в пределах аминокислотных остатков 21–118 последовательности, показанной на Фиг. 1. Он предпочтительно представляет собой эпитоп, причем связывание переменного домена к LGR5 с LGR5 уменьшается с помощью одной или более из следующих замен аминокислотных остатков D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A в LGR5.

40 В изобретении дополнительно предложено антитело с переменным доменом, связывающимся с внеклеточным участком EGFR, и переменным доменом, связывающимся с внеклеточным участком LGR5, причем переменный домен к LGR5 связывается на LGR5 с эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 21–118 последовательности, показанной на Фиг. 1

45 Эпитоп на LGR5 предпочтительно представляет собой конформационный эпитоп. Эпитоп предпочтительно расположен в пределах аминокислотных остатков 40–95 последовательности, показанной на Фиг. 1. Связывание антитела с LGR5 предпочтительно уменьшается посредством одной или более из следующих замен аминокислотных остатков: D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A.

50 Без ограничений, накладываемых теорией, считается, что остатки M46, F67, R90 и F91 в LGR5, показанные на Фиг. 1, представляют собой остатки, контактирующие с переменным

доменом, описанным выше в настоящем документе, т. е. с антигенсвязывающим сайтом
вариабельного домена, который может связываться с эпитопом LGR5. Уменьшение связывания с
антителом в результате замены аминокислотных остатков D43A и G44A может быть связано с тем
фактом, что они представляют собой контактирующие остатки, однако также возможно, что замена
5 этих аминокислотных остатков индуцирует (незначительную) модификацию конформации участка
LGR5, в котором имеется один или более других контактирующих остатков (т. е. в положениях 46,
67, 90 или 91), и такое конформационное изменение приводит к уменьшению связывания с
антителом. Эпитоп характеризуется упомянутыми аминокислотными заменами. Связывается ли
антитело с тем же эпитопом, можно определить различными способами. Предпочтительный способ
10 описан в примерах. В способе используют клетки яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO
экспрессируют LGR5 на клеточной мембране или мутанта с аланиновой заменой, предпочтительно
мутанта, содержащего одну или более замен M46A, F67A, R90A или F91A. Тестовое антитело
вводят в контакт с клетками CHO и сравнивают связывание антитела с клетками. Тестовое антитело
связывается с эпитопом при связывании с LGR5 и в меньшей степени с LGR5 с заменой M46A,
15 F67A, R90A или F91A. Предпочтительно проводить сравнение с панелью мутантов, каждый из
которых содержит одну замену на остаток аланина. Такие исследования связывания хорошо
известны в данной области. Часто панель содержит мутанты с одиночной аланиновой заменой,
охватывающие по существу все аминокислотные остатки. В случае LGR5 панель должна
охватывать внеклеточный участок белка и участок, который обеспечивает связь с клеточной
20 мембраной, конечно, при использовании клеток. Экспрессия конкретного мутанта может быть
нарушена, но это легко обнаруживается с помощью одного или более антител к LGR5, которые
связываются с другой (-ими) областью (-ями). Если для этих контрольных антител экспрессия также
снижена, то у данного конкретного мутанта может быть снижена концентрация белка на мембране
или может быть нарушена его укладка. Характеристики связывания тестового антитела с панелью
25 легко показывают, наблюдается ли уменьшенное связывание тестовых антител с мутантами,
имеющими замену M46A, F67A, R90A или F91A, и, следовательно, является ли тестовое антитело
антителом изобретения. Уменьшенное связывание с мутантами, имеющими замену M46A, F67A,
R90A или F91A, также указывает на наличие эпитопа, расположенного в пределах аминокислотных
остатков 21–118 последовательности, как показано на Фиг. 1. В предпочтительном варианте
30 осуществления панель включает в себя мутанта с заменой D43A; мутанта с заменой G44A или оба
варианта. Антитело с последовательностью VH MF5816 демонстрирует уменьшенное связывание с
мутантами с этими заменами.

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, считается, что аминокислотные
35 остатки I462; G465; K489; I491; N493; и C499, как показано на Фиг. 2, участвуют в связывании
эпитопа с антителом, включая вариабельный домен, как указано выше. Участие в связывании
предпочтительно определяют путем наблюдения уменьшенного связывания вариабельного домена
с EGFR с одной или более замен аминокислотных остатков, выбранных из I462A; G465A; K489A;
I491A; N493A; и C499A.

40 В одном аспекте вариабельный домен, который связывается с эпитопом на внеклеточном
участке человеческого EGFR, представляет собой вариабельный домен, который связывается с
эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 420–480 последовательности,
изображенной на Фиг. 2. Предпочтительно связывание вариабельного домена с EGFR уменьшается
45 посредством одной или более из следующих замен аминокислотных остатков: I462A; G465A;
K489A; I491A; N493A; и C499A в EGFR. Связывание антитела с человеческим EGFR
предпочтительно препятствует связыванию EGF с рецептором. Эпитоп на EGFR предпочтительно
представляет собой конформационный эпитоп. В одном аспекте эпитоп расположен в пределах
аминокислотных остатков 420–480 последовательности, изображенной на Фиг. 2, предпочтительно
50 в пределах остатков 430–480 последовательности, изображенной на Фиг. 2; предпочтительно в
пределах остатков 438–469 последовательности, показанной на Фиг. 2.

Без ограничений, накладываемых теорией, предполагается, что контактирующие остатки эпитопа, т. е. где переменный домен контактирует с человеческим EGFR, вероятно, представляют собой I462; K489; I491; и N493. Аминокислотные остатки G465 и C499, вероятно, косвенно участвуют в связывании антитела с EGFR, вероятно, в связи с тем, что мутация посредством замены на аланин индуцирует (незначительное) конформационное изменение эпитопа, которое приводит к уменьшенному связыванию с эпитопом.

Варибельный домен, который связывается с человеческим EGFR, предпочтительно представляет собой переменный домен, имеющий переменную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере последовательность CDR3 VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH-цепи MF3755, показанной на Фиг. 8.

Варибельный домен, который связывается с человеческим EGFR, предпочтительно представляет собой переменный домен с переменной областью тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH-цепи MF3755, как показано на Фиг. 8; или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH-цепи MF3755, как показано на Фиг. 8, с не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотной заменой.

Варибельный домен, который связывается с человеческим EGFR, предпочтительно представляет собой переменный домен с переменной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность VH-цепи MF3755, как показано на Фиг. 8; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию по сравнению с VH-цепью MF3755.

В одном варианте осуществления антитело содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5,

причем переменная область тяжелой цепи указанного переменного домена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 специфичной к EGFR переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на Фиг. 8, или при этом переменная область тяжелой цепи указанного переменного домена содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем по трем, предпочтительно не более чем по двум, предпочтительно не более чем по одной аминокислоте от последовательности CDR3 VH-цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, как показано на Фиг. 8. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательность CDR3 MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, как показано на Фиг. 8.

Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 специфической к EGFR области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на Фиг. 8, или переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности по меньшей мере CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 специфичной к EGFR переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, как показано на Фиг. 8. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, как показано на Фиг. 8. Предпочтительная переменная

область тяжелой цепи представляет собой MF3755. Другая предпочтительная переменная область тяжелой цепи представляет собой MF4280.

Антитело содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, причем переменные домены, связывающиеся с EGFR, содержат CDR1, CDR2, CDR3, и/или последовательность VH, указанную выше в данном документе, и предпочтительно антитело имеет связывающийся с LGR5 переменный домен, который содержит по меньшей мере последовательность CDR3 специфической к LGR5 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, показанных на Фиг. 8, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем по трем, предпочтительно не более чем по двум, предпочтительно не более чем по одной аминокислоте от последовательности CDR3 VH-цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, как показано на Фиг. 8. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательность CDR3 MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, как показано на Фиг. 8.

Переменный домен к LGR5 предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 специфической к LGR5 области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, показанных на Фиг. 8, или последовательности по меньшей мере CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 специфичной к LGR5 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, как показано на Фиг. 8. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, как показано на Фиг. 8. Предпочтительные переменные области тяжелой цепи представляют собой MF5790; MF5803; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818. Особенно предпочтительные переменные области тяжелой цепи представляют собой MF5790; MF5814; MF5816; и MF5818; предпочтительно MF5814, MF5818 и MF5816, особенно предпочтительна переменная область тяжелой цепи MF5816. Другая предпочтительная переменная область тяжелой цепи представляет собой MF5818.

Было показано, что антитела, содержащие один или более переменных доменов с переменной областью тяжелой цепи MF3755 или с одной или более областями CDR, обладают более высокой эффективностью при использовании для ингибирования роста раковой опухоли или клетки, отвечающей на лиганд EGFR. В контексте биспецифических или мультиспецифических антител плечо антитела, содержащее переменный домен с переменной областью тяжелой цепи MF3755 или одной или более CDR, хорошо сочетается с плечом, содержащим переменный домен с переменной областью тяжелой цепи MF5818 или одной или более CDR.

VH-цепи переменных доменов, которые связываются с EGFR или LGR5, могут иметь одну или более аминокислотных замен по отношению к последовательности, изображенной на Фиг. 8. VH-цепь предпочтительно имеет аминокислотную последовательность VH-цепи к EGFR или LGR5, как показано на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, по сравнению с последовательностью VH-цепи, показанной на Фиг. 8.

Последовательности CDR могут иметь одну или более замен аминокислотных остатков по отношению к последовательности CDR, показанной на фигурах. Такие одна или более замен, например, вводят для целей оптимизации, предпочтительно для того, чтобы увеличить силу

связывания или стабильность антитела. Например, оптимизацию выполняют, используя процедуры мутагенеза, после которых предпочтительно исследуют стабильность и/или аффинность связывания полученных антител и предпочтительно отбирают улучшенную EGFR-специфическую последовательность CDR или LGR5-специфичную последовательность CDR. Специалист в данной области может легко получить варианты антитела, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR в соответствии с изобретением. Например, могут быть выполнены консервативные аминокислотные замены. Примеры консервативной аминокислотной замены включают в себя замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, такую как замена аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамина на аспарагин.

Предпочтительно упомянутые не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен в VH или VL, как указано в данном документе, предпочтительно являются консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные вставки, делеции и замены в VH или VL, описанные в настоящем документе, предпочтительно отсутствуют в области CDR3. Упомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно отсутствуют в областях CDR1 и CDR2. Упомянутые аминокислотные вставки, делеции и замены также предпочтительно отсутствуют в области FR4.

Упомянутые не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен предпочтительно являются консервативными аминокислотными заменами, а вставки, делеции, замены или их комбинация предпочтительно находятся не в области CDR3 VH-цепи, предпочтительно не в области CDR1, CDR2 или CDR3 VH-цепи и предпочтительно не в области FR4.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком LGR5, предпочтительно содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8; или
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, по сравнению с указанной VH; и причем VH-цепь переменного домена, который связывается с LGR5, содержит:
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5790, показанную на Фиг. 8; или
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5790, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, по сравнению с указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывается с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, который связывается с внеклеточным участком LGR5, предпочтительно содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8; или
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, по сравнению с указанной VH; и причем VH-цепь переменного домена, который связывается с LGR5, содержит:
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5803, показанную на Фиг. 8; или
- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5803, показанную на Фиг. 8, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, по сравнению с указанной VH.

Дополнительные варианты описанных аминокислотных последовательностей, которые сохраняют способность связывания с EGFR или LGR5, можно получать, например, из библиотек фаговых дисплеев, которые содержат перестроенную человеческую область IGKV1-39/IGKJ1 VL (De Kruijff et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010 (106)741–50), и можно использовать набор областей VH, содержащих аминокислотные замены в аминокислотной последовательности области VH к EGFR или LGR5, как описано в настоящем документе, описание представлено ранее (например, в публикации WO2017/069628). Фаги, кодирующие Fab-участки, которые связываются с EGFR или LGR5, могут быть выбраны и проанализированы с помощью проточной цитометрии и секвенированы для идентификации вариантов с аминокислотными заменами, вставками, делециями или добавлениями, которые сохраняют антигенсвязывающую способность.

Вариабельные области легкой цепи переменных доменов VH/VL к EGFR и LGR5 антитела к EGFR/LGR5 могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах осуществления VL-область переменного домена VH/VL антитела к EGFR/LGR5 сходна с VL-областью переменного домена VH/VL к LGR5. В определенных вариантах осуществления VL-области первого и второго переменных доменов VH/VL идентичны.

В определенных вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит общую переменную область общей легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменная область общей легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит V-сегмент переменной области IgVκ1-39 зародышевой линии. В определенном варианте осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL 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 переменная область каппа иммуноглобулина 1–39; IGKV139; IGKV1-39. Внешними идентификаторами для гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Аминокислотная последовательность подходящей V-области представлена на Фиг. 9. V-область можно скомбинировать с одной из пяти J-областей. Предпочтительные J-области представляют собой jk1 и jk5, а соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; 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 одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит легкую каппа-цепь IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ1*05 (описана на Фиг. 9).

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к EGFR/LGR5 содержит область LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (показана на Фиг. 9), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS (показана на Фиг. 9), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (показана на Фиг. 9) (т. е. области CDR из IGKV1-39 в соответствии с IMGT). В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит область LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (показана на Фиг. 9), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AASLQS (показана на Фиг. 9), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (показана на Фиг. 9).

В некоторых вариантах осуществления один или оба переменных домена VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержат переменную 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 на Фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления один или оба переменных домена VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержат переменную 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 на Фиг. 9.

5 Например, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного или обоих вариабельных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 может иметь от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию по отношению к последовательности на Фиг. 9. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного или обоих вариабельных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 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, 10 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 или обоих вариабельных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит аминокислотную 15 последовательность, показанную на Фиг. 9. В определенных вариантах осуществления оба вариабельных домена VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержат идентичные VL-области. В одном варианте осуществления VL обоих вариабельных доменов VH/VL биспецифического антитела к EGFR/LGR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную на Фиг. 9. В одном варианте осуществления VL обоих вариабельных доменов VH/VL биспецифического антитела к 20 EGFR/LGR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную на Фиг. 9.

Антитело к EGFR/LGR5, описанное в данном документе, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два вариабельных домена, один из которых связывается с EGFR, а другой связывается с LGR5, как описано в данном документе.

25 Биспецифические антитела к EGFR/LGR5 для применения в способах, описанных в настоящем документе, могут быть представлены в ряде форматов. В данной области известно множество различных форматов биспецифических 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 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 биспецифического антитела, не являющиеся классическими антителами с двумя комбинациями VH/VL, 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, монотелом, VH и Fab-фрагментом, который обеспечивает вторую связывающую активность.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела к EGFR/LGR5, применяемые в способах, предложенных в настоящем изобретении, по существу 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 являются предпочтительными из-за подходящего периода полувыведения и в связи с низкой иммуногенностью. Соответственно, в определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 представляет собой полноразмерную молекулу IgG. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 45 представляет собой полноразмерную молекулу IgG1.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 содержит кристаллизующийся фрагмент (Fc). Fc-фрагмент биспецифического антитела к EGFR/LGR5 предпочтительно состоит из человеческой константной области. Константная область или Fc биспецифического антитела к EGFR/LGR5 может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных различий по сравнению с константной областью человеческого антитела природного происхождения. Например, 50

в определенных вариантах осуществления каждое Fab-плечо биспецифических антител может дополнительно включать область Fc, содержащую модификации, способствующие образованию биспецифического антитела, способствующие стабилизации и/или другим характеристикам, описанным в настоящем документе.

5

Биспецифические антитела, как правило, продуцируются клетками, которые экспрессируют нуклеиновую (-ые) кислоту (-ы), кодирующую (-ие) антитело. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела к EGFR/LGR5, описанные в настоящем документе, продуцируются путем получения клетки, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют переменные области тяжелой и легкой цепей и константные области биспецифического антитела к EGFR/LGR5. Клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно человеческую клетку. Подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать биспецифическое антитело к EGFR/LGR5.

10

15

Подходящие клетки для продукции антител известны в данной области и включают в себя клетку гибридомы, клетку яичник китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6. Различные учреждения и компании разрабатывали клеточные линии для крупномасштабного получения антител, например для клинического использования. Не имеющими ограничительного характера примерами 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 функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой клеточной линии является клеточная линия PER.C6 или ее эквивалент. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительным является вариант, в котором для экспрессии антитела используют векторную систему, содержащую ген глутаминсинтетазы (GS). В одном предпочтительном варианте осуществления клетка представляет собой клетку CHO.

20

25

30

В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует различные легкие и тяжелые цепи, которые образуют биспецифическое антитело к EGFR/LGR5. В определенных вариантах осуществления клетка экспрессирует две различные 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 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, таким образом можно получить антитела с различной специфичностью, что облегчает создание биспецифических молекул (De Kruijff et al. J. Mol. Biol. 2009 (387) 548 58; WO2009/157771).

35

40

Продуцирующая антитело клетка, которая экспрессирует общую легкую цепь и 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 соответствующими моноспецифическими антителами. Как правило, это можно обеспечить путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, чтобы они способствовали гетеродимеризации (т. е. димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелая/легкая цепь) по сравнению с гомодимеризацией. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело изобретения содержит две разные тяжелые

45

50

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 иммуноглобулина. В данной области описаны различные способы, с помощью которых можно

5 обеспечить такую гетеродимеризацию тяжелых цепей.

Один предпочтительный способ продуцирования биспецифического антитела к EGFR/LGR5 описан в US 9,248,181 и US 9,358,286. В частности, предпочтительными мутациями для продуцирования по существу только молекул биспецифического полноразмерного IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация EU) в первом домене CH3 (тяжелая

10 цепь «КК-варианта») и аминокислотные замены L351D и L368E во втором домене (тяжелая цепь «DE-варианта»), или наоборот. Как было описано ранее, DE-вариант и КК-вариант предпочтительно объединяются в пару с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифических молекул DEKK). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или КК-варианта тяжелых цепей (гомодимеры КККК) происходит с трудом

15 вследствие сильного отталкивания друг от друга заряженных остатков на границе раздела CH3–CH3 между идентичными тяжелыми цепями.

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

20 вариабельный домен, связывающийся с LGR5, содержит вариант КК тяжелой цепи.

Потенциальное биспецифическое антитело IgG к EGFR/LGR5 можно протестировать на связывание с использованием любого подходящего анализа. Например, связывание с экспрессированными на мембране EGFR или LGR5 на клетках-CHO можно оценить с помощью

25 проточной цитометрии (в соответствии с процедурой FACS, как описано ранее в WO2017/069628). В одном варианте осуществления связывание потенциального биспецифического антитела к EGFR/LGR5 с LGR5 на клетках CHO демонстрируют путем проточной цитометрии, выполняемой в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области. Связывание с клетками CHO сравнивают с клетками CHO, которые не были трансфицированы экспрессионными

30 кассетами для EGFR и/или LGR5. Связывание потенциального биспецифического IgG1 с EGFR определяли с использованием клеток CHO, трансфицированных конструктом для экспрессии EGFR; моноспецифическое антитело к LGR5 и моноспецифическое антитело к EGFR, а также нерелевантное мАт IgG1 изотипического контроля включены в анализ в качестве контролей (например, антитело, которое связывается с LGR5 и другим антигеном, таким как столбнячный

35 токсин (TT)).

Аффинности Fab к LGR5 и EGFR потенциального биспецифического антитела к EGFR/LGR5 для их мишеней можно измерить с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием BIAcore T100. Вкратце, мышинное моноклональное антитело к

40 человеческому IgG (Becton and Dickinson, кат. № 555784) соединяют с поверхностями сенсорного чипа CM5 с использованием реакции со свободными аминами (NHS/EDC). Затем bsAb фиксируют на поверхности сенсора. Впоследствии рекомбинантные очищенные антигены человеческого EGFR (Sino Biological Inc, кат. № 11896-H07H) и человеческий белок LGR5 проводят над поверхностью сенсора в диапазоне концентраций для измерения скоростей ассоциации и диссоциации. После

45 каждого цикла поверхность сенсора регенерируют потоком HCl и снова фиксируют bsAb. На основании полученных сенсограмм определяют скорости ассоциации и диссоциации и значения аффинности для связывания с человеческим LGR5 и EGFR с использованием программного обеспечения BIAevaluation, как описано ранее для CD3 в US 2016/0368988.

Антитело по изобретению, как правило, представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело, предпочтительно человеческое антитело подкласса IgG. Антитело настоящего изобретения предпочтительно представляет собой человеческое антитело

50

подкласса IgG1. Такие антитела изобретения обладают хорошими свойствами, связанными с антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (ADCC), которые при необходимости могут быть усилены с использованием методик, известных в данной области, и имеют подходящий период полувыведения при введении *in vivo* людям. Кроме того, доступна технология искусственного создания СНЗ для получения модифицированных тяжелых цепей, которые предпочтительно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры, при коэкспрессии в клонированных клетках.

Активность ADCC антитела может быть повышена в случае, когда само антитело обладает низкой активностью ADCC, путем небольшой модификации константной области антитела. Другой способ повышения активности ADCC антитела заключается в ферментативном воздействии на путь гликозилирования, что приводит к снижению содержания фукозы. Существует несколько способов определения *in vitro* эффективности антител или эффекторных клеток при индуцировании ADCC. Среди них можно выделить анализы высвобождения хрома-51 [Cr51], анализы высвобождения европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S35]. Как правило, меченую линию клеточных мишеней, экспрессирующих определенный поверхностный антиген, инкубируют с антителом, специфичным к данному антигену. После промывки эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецептор CD16, совместно инкубируют с мечеными антителом клетками-мишенями. После этого определяют лизис клеток-мишеней посредством измерения высвобожденной внутриклеточной метки с помощью сцинтилляционного счетчика или спектрофотометра.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело изобретения может иметь улучшенную ADCC. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело изобретения может быть афукозилированным. Биспецифическое антитело изобретения предпочтительно имеет сниженный уровень фукозилирования N-связанной углеводной структуры в области Fc по сравнению с таким же антителом, продуцируемым в нормальной клетке CHO.

Антитело, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, может дополнительно содержать один или более дополнительных переменных доменов, которые могут связываться с одной или более дополнительными мишенями. Дополнительная мишень предпочтительно представляет собой белок, предпочтительно мембранный белок, содержащий внеклеточный участок. Антитела с более чем двумя переменными доменами известны в данной области. Например, дополнительный переменный домен можно присоединить к константной области антитела. Антитело с тремя или более переменными доменами предпочтительно представляет собой поливалентное мультимерное антитело, описанное в публикации PCT/NL 2019/050199, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее два переменных домена, причем один переменный домен связывается с внеклеточным участком EGFR, а другой переменный домен связывается с внеклеточным участком LGR5. Переменные домены предпочтительно представляют собой переменные домены, описанные в настоящем документе.

Во избежание сомнений следует уточнить, что термин «рост клетки» в настоящем документе относится к изменению количества клеток. Ингибирование роста означает снижение количества клеток, которое было бы получено в ином случае. Ускорение роста означает увеличение количества клеток, которое было бы получено в ином случае. Фраза «рост клеток», как правило, относится к пролиферации клеток.

В настоящем документе мембранный белок представляет собой белок клеточной мембраны, такой как белок, который находится в наружной мембране клетки, которая отделяет клетку от внешнего мира. Мембранный белок имеет внеклеточный участок. Мембранный белок

находится по меньшей мере на клетке, если он включает в себя трансмембранную область, которая находится внутри клеточной мембраны клетки.

5 Кроме того, предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое
антитело к EGFR/LGR5, ингибитор топоизомеразы I и фармацевтически приемлемый носитель. При
использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает
одобренный государственным регулирующим органом или перечисленный в Фармакопее США или
другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, в частности у людей, и включает
10 все возможные растворители, соли, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и
противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие поглощение агенты и т. п., которые
физиологически совместимы. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту,
эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят соединение. Фармацевтические
носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масла, включая масла,
15 получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения,
например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло,
глицеринполиэтиленгликольрицинолеат и т. п. В качестве носителей, в частности для
инъекционных растворов, можно использовать воду или водные солевые растворы и водные
растворы декстрозы и глицерина. Жидкие композиции для парентерального введения могут быть
20 обеспечены для введения путем инъекции или непрерывной инфузии. Способы введения путем
инъекции или инфузии включают интравезикальный, интратуморальный, внутривенный,
внутрибрюшинный, внутримышечный, подоболочечный и подкожный. В зависимости от способа
введения (например, внутривенно, подкожно, внутрь сустава и т. п.) активное соединение может
быть покрыто материалом для его защиты от действия кислот и других естественных условий,
которые могут инактивировать соединение.

25 Фармацевтические композиции, подходящие для введения человеческим пациентам, как
правило, обеспечены для парентерального введения, например, в жидком носителе, или подходят
для разведения в жидком растворе или суспензии для внутривенного введения. Композиции могут
быть получены в виде единичной дозированной формы для упрощения введения и единообразия
30 дозы.

Кроме того, включены твердые препараты, предназначенные для превращения,
непосредственно перед использованием, в жидкие препараты для перорального или
парентерального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии.

35 Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, особенно полезны для
лечения рака у пациента, в частности рака желудочно-кишечного тракта. Соответственно,
композиции и способы можно использовать при лечении различных злокачественных опухолей.

40 При использовании в настоящем документе комбинированное (совместное) введение
включает одновременное введение биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора
топоизомеразы I в одной и той же или различных лекарственных формах, раздельное введение или
последовательное введение. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления
биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно использовать в способе лечения рака у субъекта,
причем биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят одновременно, раздельно или
45 последовательно с ингибитором топоизомеразы I. В других вариантах осуществления
биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно использовать в лечении рака у субъекта, причем
биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно вводить одновременно, раздельно или
последовательно с ингибитором топоизомеразы I.

50 В других вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно
использовать для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта,
причем биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят одновременно, раздельно или

последовательно с ингибитором топоизомеразы I. В других вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно использовать для применения в производстве лекарственного средства с использованием при лечении рака у субъекта, причем биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором топоизомеразы I. Продукт, содержащий биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I, может представлять собой комбинированный препарат для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении рака у субъекта.

Биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I можно вводить в соответствии с подходящими дозировкой и способом введения (например, внутривенным, внутривенным, внутримышечным, подкожным или подкожным).

Биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I также можно вводить в соответствии с любой подходящей схемой. Например, биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I можно вводить одновременно в одном составе. В альтернативном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I можно получать для отдельного введения, причем их вводят одновременно или последовательно.

Например, в некоторых вариантах осуществления сначала можно вводить биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 с последующим введением ингибитора топоизомеразы I, или наоборот. Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа).

Например, можно выполнить одно болюсное введение, вводить несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить в соответствии с показаниями терапевтической ситуации. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят перед введением ингибитора топоизомеразы I, например, сначала пациенту вводят биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 с последующим введением ингибитора топоизомеразы I. В одном варианте осуществления ингибитор топоизомеразы I вводят перед введением биспецифического антитела к EGFR/LGR5, например, сначала пациенту вводят ингибитор топоизомеразы I с последующим введением биспецифического антитела к EGFR/LGR5 (например, через одну или более минут, часов или дней). Такое одновременное или последовательное введение приводит к одновременному присутствию как биспецифического антитела к EGFR/LGR5, так и ингибитора топоизомеразы I у получавших лечение пациентов. Одновременное присутствие как биспецифического антитела к EGFR/LGR5, так и ингибитора топоизомеразы I будет способствовать лечению рака, индуцированному биспецифическим антителом к EGFR/LGR5, и опосредованному биспецифическим антителом к EGFR/LGR5 ингибированию сигнализации EGFR/LGR5.

В другом варианте осуществления с ингибитор топоизомеразы I и биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят одновременно.

В одном варианте осуществления субъекту вводят одну дозу ингибитора топоизомеразы I и одну дозу биспецифического антитела к EGFR/LGR5. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I вводят несколько раз в течение курса лечения. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту, нуждающемуся в лечении, вводят множество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) доз ингибитора топоизомеразы I и множество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) доз биспецифического антитела к EGFR/LGR5.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора топоизомеразы I и биспецифического антитела к EGFR/LGR5 можно проводить еженедельно, раз в две недели или ежемесячно, в этом режиме их можно вводить в один и тот же день (например, одновременно) или последовательно (например, один из ингибитора или антитела вводят через одну или более минут, часов или дней до или после другого из ингибитора или антитела). При раздельном введении биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I можно, но это необязательно, вводить в соответствии с одним и тем же протоколом введения (т. е. дозирования). Например, один цикл лечения может включать введение биспецифического антитела к EGFR/LGR5 один или несколько раз, тогда как терапевтически эффективную дозу ингибитора топоизомеразы I можно вводить чаще или реже по сравнению с биспецифическим антителом к EGFR/LGR5. В определенных вариантах осуществления введение каждой дозы ингибитора топоизомеразы I и биспецифического антитела к EGFR/LGR5 может осуществляться в один и тот же день, или в альтернативном варианте осуществления ингибитор топоизомеразы I можно вводить за один или более дней до или после антитела к EGFR/LGR5.

В некоторых вариантах осуществления дозу биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и/или ингибитора топоизомеразы I изменяют с течением времени. Например, биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и/или ингибитор топоизомеразы I можно сначала вводить в высокой дозе, а с течением времени дозу можно уменьшать. В другом варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и/или ингибитор топоизомеразы I сначала вводят в низкой дозе, а с течением времени дозу увеличивают.

В другом варианте осуществления количество вводимого биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и/или ингибитора топоизомеразы I является постоянным для каждой дозы. В другом варианте осуществления количество биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и/или ингибитора топоизомеразы I изменяется с каждой дозой. Например, поддерживающая (или дополнительная) доза каждого лекарственного средства может быть выше или равна первой введенной насыщающей дозе. В другом варианте осуществления поддерживающая доза каждого лекарственного средства может быть ниже или равна насыщающей дозе. Врач может использовать предпочтительные дозы в зависимости от состояния получающего лечение пациента. Доза может зависеть от ряда факторов, в том числе от стадии заболевания и т. п. Конкретная доза, которую необходимо вводить при наличии одного или более таких факторов, находится в пределах уровня знаний специалиста в данной области. Как правило, лечение инициируют меньшими дозами, которые меньше оптимальной дозы соединения. После этого дозу увеличивают на небольшие количества до тех пор, пока не будет обеспечен оптимальный эффект при данных обстоятельствах. Для удобства общую суточную дозу при желании можно разделить и вводить порциями в течение дня. Можно также применять периодическую терапию (например, одну неделю из трех или три недели из четырех).

В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят в дозе 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела. В другом варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 вводят в дозе 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела.

Способ лечения, описанный в настоящем документе, как правило, продолжают, пока врач, контролирующий лечение пациента, считает, что способ лечения является эффективным, т. е. что пациент реагирует на лечение. Не имеющие ограничительного характера параметры, которые указывают на эффективность способа лечения, могут включать в себя одно или более из следующего: снижение количества опухолевых клеток; ингибирование пролиферации опухолевых клеток; уничтожение опухолевых клеток; выживаемость без прогрессирования; надлежащий ответ на лечение, установленный с помощью соответствующего опухолевого маркера (если применимо).

Что касается частоты введения биспецифического антитела к EGFR/LGR5, то специалист в данной области сможет определить соответствующую частоту. Например, врач может принять решение о введении биспецифического антитела к EGFR/LGR5 относительно нечасто (например, один раз в две недели) и постепенно сокращать период между дозами, в зависимости от переносимости пациентом. Что касается частоты введения ингибитора топоизомеразы I, частоту для этих агентов можно определить аналогичным образом. Примеры периодов времени, связанных со сроком терапии в соответствии с заявленным способом, включают приблизительно одну неделю; две недели; приблизительно три недели; приблизительно четыре недели; приблизительно пять недель; приблизительно шесть недель; приблизительно семь недель; приблизительно восемь недель; приблизительно девять недель; приблизительно десять недель; приблизительно одиннадцать недель; приблизительно двенадцать недель; приблизительно тринадцать недель; приблизительно четырнадцать недель; приблизительно пятнадцать недель; приблизительно шестнадцать недель; приблизительно семнадцать недель; приблизительно восемнадцать недель; приблизительно девятнадцать недель; приблизительно двадцать недель; приблизительно двадцать одну неделю; приблизительно двадцать две недели; приблизительно двадцать три недели; приблизительно двадцати четыре недели; приблизительно семь месяцев; приблизительно восемь месяцев; приблизительно девять месяцев; приблизительно десять месяцев; приблизительно одиннадцать месяцев; приблизительно двенадцать месяцев; приблизительно тринадцать месяцев; приблизительно четырнадцать месяцев; приблизительно пятнадцать месяцев; приблизительно шестнадцать месяцев; приблизительно семнадцать месяцев; приблизительно восемнадцать месяцев; приблизительно девятнадцать месяцев; приблизительно двадцать месяцев; приблизительно двадцать один месяц; приблизительно двадцать два месяца; приблизительно двадцати три месяца; приблизительно двадцать четыре месяца; приблизительно тридцать месяцев; приблизительно три года; приблизительно четыре года; приблизительно пять лет; бессрочно (например, в случае непрерывной поддерживающей терапии). Вышеуказанная продолжительность может быть связана с одним или множеством серий/циклов лечения.

Эффективность способов лечения, предложенных в настоящем документе, можно оценить с помощью любых подходящих средств. В одном варианте осуществления клиническую эффективность комбинированного лечения анализируют с использованием уменьшения количества раковых клеток в качестве объективного критерия ответа на лечение. У пациентов, например людей, получавших лечение в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, предпочтительно наблюдается улучшение по меньшей мере одного признака рака. В некоторых вариантах осуществления может происходить одно или более из следующего: уменьшение количества раковых клеток; предотвращение или задержка рецидива рака; ослабление в определенной степени одного или более симптомов, связанных с раком. Кроме того, анализы *in vitro* используют для определения опосредованного Т-клетками лизиса клеток-мишеней.

В другом варианте осуществления способы лечения обеспечивают сопоставимую частоту клинической эффективности ((CBR) — полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) \geq 6 месяцев) лучше, чем при использовании только биспецифического антитела к EGFR/LGR5 или ингибитора топоизомеразы I (например, иринотекана) по отдельности.

В некоторых вариантах осуществления опухолевые клетки перестают обнаруживаться после лечения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект находится в частичной или полной ремиссии. В определенных вариантах осуществления субъект имеет повышенную общую выживаемость, медианную частоту выживаемости и/или выживаемость без прогрессирования заболевания.

Комбинации настоящего изобретения (например, биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 в комбинации с ингибитором топоизомеразы I) также можно применять в сочетании с другими хорошо известными способами лечения, которые выбраны в связи с их особой полезностью в отношении подвергаемого лечению рака. В альтернативном варианте осуществления комбинации

настоящего изобретения можно при необходимости использовать последовательно с известным (-ыми) фармацевтически приемлемым (-ыми) агентом (-ами).

5 Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических препаратов известны специалистам в данной области. Кроме того, способы их введения описаны в стандартной литературе. Например, способы введения многих химиотерапевтических препаратов описаны в Physicians' Desk Reference (PDR), например 1996 (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); описание полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

10 Специалистам в данной области будет очевидно, что применение химиотерапевтического (-их) агента (-ов) и/или радиационной терапии можно изменять в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известного влияния химиотерапевтического (-их) агента (-ов) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного врача терапевтические протоколы (например, количества доз и время введения) можно изменять с учетом
15 наблюдаемого влияния вводимых терапевтических агентов на пациента и с учетом наблюдаемой реакции заболевания на вводимые терапевтические агенты.

В настоящем документе также предложен набор или продукт, который включает в себя фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 и ингибитор топоизомеразы I и фармацевтически приемлемый носитель, в терапевтически эффективном количестве, модифицированном для применения в предшествующих способах. В некоторых вариантах осуществления набор или продукт необязательно также может включать в себя инструкции, например, содержащие схемы введения, которые позволяют медработнику (например, врачу, медсестре или пациенту) вводить содержащуюся композицию пациенту,
25 имеющему рак.

В некоторых вариантах осуществления набор или продукт включает в себя множество упаковок фармацевтических композиций для однократного введения, каждая из которых содержит эффективное количество биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора топоизомеразы I для однократного введения в соответствии с предложенными выше способами. В набор или продукт также могут быть включены инструменты или устройства, необходимые для введения фармацевтической (-их) композиции (композиций). Например, набор или продукт может содержать один или более предварительно заполненных шприцев, содержащих единичную дозу биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора топоизомеразы I в одном и том же контейнере или в отдельных контейнерах для введения в виде отдельных и неодинаковых
35 композиций.

В определенных вариантах осуществления одно или оба из биспецифического антитела к EGFR/LGR5 и ингибитора топоизомеразы I представлены в твердой форме, подходящей для разведения и последующего введения в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

40 Функциональный участок антитела, описанного в настоящем документе, содержит по меньшей мере переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, как описано в настоящем документе. Таким образом, он содержит антигенсвязывающие участки антитела, описанные в настоящем документе, и, как правило, содержит переменные домены антитела. Переменный домен функционального участка может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент или так называемый однодоменный фрагмент антитела. Однодоменный фрагмент антитела (sdAb) представляет собой фрагмент антитела с одним мономерным переменным доменом антитела. Как и антитело целиком, он способен избирательно связываться с конкретным антигеном. С
50 молекулярной массой всего 12-15 кДа однодоменные фрагменты антитела гораздо 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). Сами по себе однодоменные антитела ненамного меньше нормальных антител (как правило, 90–100 кДа). Однодоменные фрагменты антитела в основном конструируют из антител, состоящих только из тяжелых цепей, которые найдены у представителей семейства верблюдовых; они называются VHH-фрагментами (Nanobodies®). У некоторых рыб также присутствуют антитела, состоящие только из тяжелых цепей (IgNAR, «иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор»), из которых можно получать однодоменные фрагменты антитела, называемые VNAR-фрагментами. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов обычного иммуноглобулина G (IgG) от людей или мышей на мономеры. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основаны на переменных доменах тяжелой цепи, также показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Не имеющими ограничительного характера примерами таких переменных доменов частей антитела являются VHH, человеческие доменные антитела (dAbs) и Unibodies. Предпочтительные части или производные антител имеют по меньшей мере два переменных домена антитела или их эквиваленты. Не имеющими ограничительного характера примерами таких переменных доменов или их эквивалентов являются F(ab)-фрагменты и одноцепочечные Fv-фрагменты. Функциональный участок биспецифического антитела содержит антигенсвязывающие части биспецифического антитела или производное и/или аналог связывающих частей. Как упомянуто выше в настоящем документе, связывающая часть антитела входит в состав переменного домена.

В других дополнительных вариантах осуществления композиция, или комбинация, или набор, или продукт включает в себя один или более дополнительных активных агентов.

Все документы и ссылки, включая позиции в GenBank, патенты и опубликованные заявки на патент, а также веб-сайты, описанные в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ путем ссылки так, как если бы они были полностью или частично изложены в настоящем документе.

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.

Настоящее изобретение далее описано со ссылкой на следующие примеры, которые являются только иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение. Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от существа и объема настоящего изобретения.

40 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Последовательность человеческого LGR5.

Фиг. 2. Последовательность человеческого EGFR.

45 Фиг. 3. Влияние способов лечения на объем опухоли в ортотопической модели PDX KPP M005; (a) частота инъекций, дозировка и места инъекций в течение периода лечения; (b) кратность изменения объема опухоли с течением времени; и (c) точечная диаграмма, демонстрирующая кратность изменения по мышам через 6 недель.

50 Фиг. 4(a). Объем опухоли до и после прекращения лечения в мышинной модели M005. Лечение останавливали через 9 недель, и объем опухоли у этих мышей контролировали в течение еще

3 недели. Числа под каждой группой указывают на причины, по которым не все мыши были включены в анализ через 12 недель; (b) масса тела в каждой группе с течением времени (модель M005).

- 5 Фиг. 5(a). Количество мышей, которые при умерщвлении имели метастазы, выявленные макроскопически или при оценке с помощью окрашивания H&E; (B) остаточное заболевание через 12 недель.

- 10 Фиг. 6(a). Мышиная модель M001. Частота инъекций, дозировка и место инъекции в течение периода лечения; (b) изменение среднего объема опухоли с течением времени; (c) точечная диаграмма, демонстрирующая объем опухоли по мышам через 6 недель.

- 15 Фиг. 7(a). Масса тела в каждой группе с течением времени (модель M001), комбинированное лечение не вызывало токсических эффектов; (b) лечение только биспецифическим антителом MF5816xMF3755 или биспецифическим антителом MF5816xMF3755 + иринотеканом блокировало метастазирование. Метастазы оценивали в тканях макроскопически и по окрашиванию H&E.

- 20 Фиг. 8(a). Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи MF5816xMF3755, которые вместе с переменной областью общей легкой цепи, такой как переменная область легкой каппа-цепи человека IgVκ1 39*01/IGJκ1*01, образуют переменный домен, связывающийся с LGR5 или EGFR. Области CDR и каркасные области указаны на Фиг. 8b. Последовательность ДНК указана на Фиг. 8c. На этой фигуре дополнительно описаны дополнительные переменные области тяжелой цепи, связывающие EGFR и LGR5, которые
25 подходят для получения биспецифических антител в комбинации с ингибитором топоизомеразы I.

- 30 Фиг. 9. а) Аминокислотная последовательность общей легкой цепи, б) ДНК-последовательность и трансляция переменной области общей легкой цепи (IGKV 1–39/jk1), с) ДНК-последовательность и трансляция константной области общей легкой цепи, d) трансляция переменной области общей легкой цепи IGKV 1–39/jk5. е) V-область IGKV 1–39A; f) CDR1, CDR2 и CDR3 общей легкой цепи.

- Фиг. 10. Тяжелые цепи IgG для получения биспецифических молекул; а) область CH1, б) шарнирная область, с) область CH2, d) домен CH3, содержащий вариации L351K и T366K (KK), е) домен CH3, содержащий вариации L351D и L368E (DE).

35

ПРИМЕРЫ

- В настоящем документе термин MFXXXX, в котором X независимо представляет собой число от 0 до 9, означает Fab, содержащий переменный домен, в котором VH имеет аминокислотную
40 последовательность, обозначенную 4 цифрами, показано на Фиг. 8. Если не указано иное, переменная область легкой цепи переменного домена, как правило, имеет последовательность, показанную на Фиг. 9b. Легкая цепь в этих примерах имеет последовательность, показанную на Фиг. 9a. Термин MFXXXX VH относится к аминокислотной последовательности VH, обозначенной 4 цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и
45 константную область тяжелой цепи, которая в норме взаимодействует с константной областью легкой цепи. VH/переменная область тяжелых цепей отличается, и, как правило, также отличается область CH3, причем одна из тяжелых цепей имеет мутацию KK в своем домене CH3, а другая имеет комплементарную мутацию DE в своем домене CH3 (см. для справки PCT/NL2013/050294 (опубликована как WO2013/157954) и Фиг. 10d и 10e). Биспецифические антитела в примерах
50 имеют Fc-хвост с доменом CH3 гетеродимеризации KK/DE, доменом CH2 и доменом CH1, показанными на Фиг. 10, общей легкой цепью, показанной на Фиг. 9a, и VH, обозначенной номером MF. Например, биспецифическое антитело, указанное как MF3755 xMF5816, имеет вышеуказанные

общие последовательности, переменный домен с VH с последовательностью MF3755 и переменный домен с VH с последовательностью MF5816.

Пример 1

5

Клеточные линии

Клетки Freestyle 293F (кат. № p/n51-0029) приобретали в компании Invitrogen и поддерживали согласно стандартной практике в среде 293 FreeStyle. Клеточные линии HEK293T (ATCC-CRL-11268) и CHO-K1 (DSMZ ACC110) приобретали в компании ATCC и поддерживали согласно стандартной практике в среде DMEM/F12 (Gibco), обогащенной L-глутамином (Gibco) и FBS (Lonza).

10

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности различных переменных областей тяжелой цепи (VH) показаны на Фиг. 8. Биспецифические антитела к EGFR/LGR5, MF3755xMF5814; содержащие переменные области тяжелых цепей MF3755 и MF5816 и общую легкую цепь, а также включающие модификации для усиления функции ADCC вследствие афукозилирования, оказались эффективны среди других комбинаций LGR5 и EGFR, представленных на Фиг. 9а, как показано в WO 2017/069628 (стр. 138).

15

20 Создание биспецифических антител

Биспецифические антитела создавали путем временной котрансфекции двух плазмид, кодирующих IgG, разными доменами VH с использованием собственной технологии конструирования CH3 для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифических антител. Общую легкую цепь также котрансфицировали в ту же клетку либо на той же плазмиде, либо на другой. В

одновременно поданных заявках (например, WO2013/157954 и WO2013/157953; включены в настоящий документ путем ссылки) авторы изобретения описывали способы и средства получения биспецифических антител из одиночной клетки, были предложены средства, которые повышают образование биспецифических антител по сравнению с образованием моноспецифических антител. Эти способы также можно преимущественно использовать в рамках настоящего изобретения. В

частности, предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG являются аминокислотные замены в положениях 351 и 366, например, L351K и T366K (нумерация в соответствии с нумерацией ЕС), в первом домене CH3 («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены в положениях 351 и 368, например, L351D и L368E, во втором домене CH3 («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот (см. Фиг. 10d и 10e). Ранее было продемонстрировано, что отрицательно заряженный DE-вариант тяжелой цепи и положительно заряженный КК-вариант тяжелой цепи предпочтительно объединяются в пары с образованием гетеродимеров (так называемые биспецифические молекулы DEKK). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DE-DE) или КК-варианта тяжелых цепей (гомодимеры КК-КК) происходит с трудом из-за сильного отталкивания друг от друга заряженных остатков на границе раздела CH3-CH3 между идентичными тяжелыми цепями.

25

30

35

40

Гены VH переменного домена, который связывается с LGR5, как описано выше, клонировали в вектор, кодирующий положительно заряженный домен CH3. Гены VH переменного домена, который связывается с EGFR, например, описанные в публикации WO 2015/130172 (включена в

настоящий документ путем ссылки), клонировали в вектор, кодирующий отрицательно заряженный домен CH3. Приспособленные для роста в суспензии клетки 293F Freestyle культивировали во флаконах T125 на шейкере до получения плотности $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки высевали с плотностью $0,3-0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки временно трансфицировали смесью двух плазмид, кодирующих разные антитела, клонированные в векторную систему собственной разработки. Через семь дней после трансфекции клеточный супернатант собирали и фильтровали через фильтр $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius). Стерильный супернатант хранили при 4°C до очистки антител.

45

50

Очистка IgG

Очистку выполняли в стерильных условиях в фильтровальных планшетах с использованием фильтрации. Сначала pH среды доводили до 8,0, а затем содержащие IgG супернатанты 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 фильтрованием. Гранулы дважды промывали PBS с pH 7,4. После этого связанные IgG элюировали при pH 3,0 с использованием 0,1 М цитратного буфера, а элюат сразу же нейтрализовали, используя Tris-буфер с pH 8,0. Замену буфера выполняли путем центрифугирования, используя планшеты MultiScreen Ultracel 10 (Millipore). Образцы в конечном итоге собирали в PBS с pH 7,4. Концентрацию IgG измеряли с использованием Octet. Образцы белка хранили при 4 °C.

Количественное определение IgG с использованием Octet

Для определения количества очищенных IgG измеряли концентрацию антитела с помощью анализа Octet, используя биосенсоры на основе белка А (Forte-Bio, в соответствии с рекомендациями поставщика) и общие человеческие IgG (Sigma Aldrich, кат. № I4506) в качестве стандарта.

Мыши и подготовка клеток для приживания трансплантата

Тумороиды выращивали в течение семи дней, а затем дезагрегировали с получением суспензии одиночных клеток для инъекции. Для всех исследований на мышах использовали самок мышей NOD.CB17/Alhnrj-Prkdcscid/Rj (Janvier Labs) в возрасте от 6 до 8 недель.

Условия культивирования и способ получения одиночных клеток

Органоиды, полученные из образца колоректального рака, культивировали в 100% экстрактах базальной мембраны (BME, Amsbio) при 37 °C и 5% CO₂, причем среда представляла собой улучшенную DMEM/F12 (Invitrogen), обогащенную следующими компонентами: 2 mM GlutaMax (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 1x B27, не содержащая ретиновой кислоты (Invitrogen), 50 нг/мл EGF (Peprotech), 0,1 мкг/мл Noggin (Peprotech), ингибитор Rock Y-27632 (Sigma-Aldrich), 10 нМ PGE2 (Sigma-Aldrich), 3 мкМ SB202190 (Sigma-Aldrich), 10 нМ гастрин (Tocris), 1 мкг/мл R-SPO1 (собственного изготовления), 10 mM никотинамид (Sigma-Aldrich), 1,25 mM N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich), 0,5 мкМ A83-01 (Tocris). За день до анализа органоиды разделяли на одиночные клетки. Для этого органоиды сначала освобождали от BME путем удаления культуральной среды, ресуспендировали BME в растворе для восстановления клеток (BD Biosciences) и инкубировали в течение 1 часа на льду. Затем органоиды центрифугировали (все стадии центрифугирования проводили в течение 5 минут при 200 g и 4 °C). Осадок ресуспендировали в 1 мл 50% раствора трипсин/EDTA (TE); 50% PBS, пипетировали вверх-вниз и регулярно оценивали до тех пор, пока не была получена суспензия одиночных клеток. TE разводили в 10 мл PBS и центрифугировали. Клетки дважды промывали в 10 мл PBS, а затем ресуспендировали в BME и помещали каплями объемом 50 мкл на предварительно нагретые планшеты (37 °C). Капли BME оставляли для осаждения на 15 минут, а затем к каждой капле добавляли 500 мкл среды. Через 12 часов клетки отделяли от BME с использованием раствора для восстановления клеток. Через 1 час на льду клетки центрифугировали и промывали один раз в 10 мл PBS, содержащего 0,5% BSA и 0,5 mM EDTA (буферный раствор для окрашивания). Затем осадок ресуспендировали в буферном растворе для окрашивания и подсчитывали.

45

Группа Stem Cell and Cancer Group из VHIО разработала набор моделей PDX KPP, полученных из хирургически резецированных первичных опухолей (толстой кишки и прямой кишки) и метастаз печени. Модели PDX клинически и молекулярно аннотированы и достоверно отражают клиническую эпидемиологию мКРР. Эти модели можно вводить подкожной инъекцией или ортотопически в стенку слепой кишки иммунодефицитных мышей. Ортотопические модели приводят к образованию локальных и отдаленных метастаз в лимфатических узлах, печени, легких и карциноматозам, воспроизводя распространенное заболевание у пациентов с КРР.

50

- 5 Был отобран набор моделей PDX с ключевыми молекулярными свойствами для оценки эффективности биспецифических антител к LGR5/EGFR по настоящему изобретению (см. таблицу 1). В исходном наборе PDX были выбраны несколько моделей дикого типа и мутантов. В этих моделях PDX измеряли и другие детерминанты, такие как относительная экспрессия EGFR или LGR5, что также поможет определить ответ на разработанные антитела к EGFR/LGR5 (таблица 1).
- 10 Были отобраны модели PDX, полученные из метастаз печени трех пациентов с распространенным KPP (таблица 1). Две модели представляют собой мутанта по KRAS (G13D и G12D для M005 и M001 соответственно), причем M005 также представляет собой мутанта по APC и PIK3CA 112_112del.
- 15 Модель M005. 120 мышам NOD-SCID вводили ортотопические инъекции в стенку слепой кишки по 1×10^6 опухолевых клеток, полученных из модели PDX M005, причем модель была получена по существу так, как описано в публикации Puig et al., A Personalized Preclinical Model to Evaluate the Metastatic Potential of Patient-Derived Colon Cancer Initiating Cells, Clin Cancer Res; 19(24), 6787–6801 (2013), которая полностью включена в настоящую заявку. Эти человеческие опухолевые клетки были получены из печеночных метастаз KPP, и они содержат мутации в гене *KRAS* (*KRAS G13D*) и в гене *PIK3CA* (*PIK3CA 112_112del*). См. каталог Sanger Institute, Великобритания, в котором содержатся 18 различных типов тканей, несущих мутацию PIK3C C420R (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, № мутации COSM757). Через 15 дней после инъекции использовали еженедельную КТ-визуализацию для мониторинга мышей и выявления первичных опухолей в слепой кишке. Лечение начинали после того, как по меньшей мере 80% животных имели сформировавшуюся в слепой кишке первичную опухоль. Были исключены следующие 18 мышей: погибшие после операции (5 шт), без первичной опухоли (7), со слишком маленькой или слишком крупной опухолью (2 и 1 соответственно), с низкой массой тела (2), с общими признаками заболевания (1).
- 20 Оставшиеся 102 мыши лечили в соответствии с Фиг. 3а и визуализировали еженедельно с помощью микроКТ. Частоту и размер метастатических поражений также определяли с помощью гистологической оценки печени и легких (окрашивание гематоксилином и эозином (H&E)). Перитонеальные карциноматозы регистрировали макроскопически при вскрытии и позже подтверждали гистологическим исследованием.
- 25 Модель M001. Модель PDX M001 была получена по существу так, как описано в публикации Puig et al., A Personalized Preclinical Model to Evaluate the Metastatic Potential of Patient-Derived Colon Cancer Initiating Cells, Clin Cancer Res; 19 (24), 6787–6801 (2013), которая полностью включена в настоящую заявку; См. каталог Sanger Institute, Великобритания, в котором содержатся 18 различных типов тканей, несущих мутацию PIK3C C420R (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, № мутации COSM757). Во второй ортотопической модели введенные путем инъекции опухолевые клетки человека исходно получали из печеночных метастаз KPP с мутациями: *KRAS G12D* и *PIK3CA-C420R*. Инъекции опухолевых клеток выполняли аналогично представленному выше описанию. Были исключены следующие 18 мышей: погибшие после операции (11 шт), без первичной опухоли (2), мыши со слишком крупной опухолью (2), с низкой массой тела (1), с общими признаками заболевания (2). Дозировка и схема лечения соответствовали Фиг. 6а.

45 На 6 неделе все мыши, получавшие носитель или только биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, были умерщвлены; также умерщвляли приблизительно половину мышей, получавших иринотекан или биспецифическое антитело к EGFR/LGR5 MF3755 и MF5816 + иринотекан.

Результаты

Анализ модели M005

50 Средний объем опухоли у мышей, получавших только биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, был ниже, чем у мышей, которым вводили носитель, но не таким низким, как у мышей, получавших только иринотекан. Неожиданно было обнаружено, что мыши,

получающие комбинированное лечение биспецифическим антителом к EGFR/LGR5, содержащим MF3755 и MF5816, и иринотеканом, имели более низкий объем опухолей по сравнению со всеми другими группами мышей (Фиг. 3b, 3c). Интересно, что после прекращения лечения биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, продлевает ингибирующий опухоль эффект иринотекана, что видно по кратности изменения объема опухоли (Фиг. 4a).

Первичные опухоли от всех мышей собирали при умерщвлении и анализировали на частоту и размер метастатических поражений. На Фиг. 5a показано количество мышей, у которых после умерщвления обнаружены метастатические поражения, и это демонстрирует, что мыши, получавшие биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, или иринотекан, по отдельности или в комбинации, имели меньше метастаз, чем мыши без лечения. Кроме того, анализировали ткани мышей, у которых лечение было прекращено (9 недель), и они были умерщвлены после 3-недельного периода без лечения. Было обнаружено, что опухоли меньшего размера содержат некротические клетки, или лишь небольшое количество опухолевых клеток, тогда как большинство более крупных опухолей содержат множество опухолевых клеток (Фиг. 5b). Этот анализ показал положительную корреляцию объема опухоли и массы слепой кишки у получавших лечение мышей через 3 недели после прекращения лечения ($P < 0,0001$ для коэффициента корреляции Пирсона).

20 Анализ модели M001

Средний объем опухоли у мышей, получавших только биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, был очень сходным с наблюдаемым у мышей, получавших только иринотекан. Однако мыши, получающие комбинированное лечение биспецифическим антителом к EGFR/LGR5, содержащим MF3755 и MF5816, и иринотеканом, имели меньший объем опухоли по сравнению любой другой группой мышей (Фиг. 6b,c). У мышей, получавших комбинацию биспецифического антитела EGFR/LGR5, содержащего MF3755 и MF5816, и иринотекана (Фиг. 7a), не было отмечено токсичности.

Гистологический анализ после умерщвления для определения метастатических поражений показал, что мыши, получавшие биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, или иринотекан, по отдельности или в комбинации, имели меньше метастаз, чем мыши без лечения (Фиг. 7b).

Исследовали две ортотопические модели M005 и M001 с применением биспецифического антитела EGFR/LGR5, содержащего MF3755 и MF5816, и химиотерапевтического агента иринотекана, по отдельности и в комбинации, для анализа их потенциала ингибирования роста опухоли и метастатического потенциала. В случае модели M005 биспецифическое антитело EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, и иринотекан по отдельности были способны задерживать рост первичной опухоли, но комбинация из показанного биспецифического антитела EGFR/LGR5, содержащего MF3755 и MF5816, и иринотекана обеспечивала более эффективный ответ. После прекращения лечения комбинированное лечение полностью устранило первичные опухоли у пяти из пяти выживших мышей. В случае монотерапии иринотеканом это наблюдали только у 1 из 14 мышей. Это также указывает на то, что биспецифическое антитело EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, усиливает полную регрессию опухоли, вызванную химиотерапией. Что касается метастатического потенциала, биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, блокировало образование отдаленных метастаз, как и иринотекан. У мышей, получавших комбинацию иринотекана и биспецифического антитела к EGFR/LGR5, содержащего MF3755 и MF5816, метастазы не наблюдали.

Результаты на модели M005 были подтверждены на модели M001. По отдельности биспецифическое антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, и иринотекан были одинаково эффективны в плане замедления роста первичной опухоли в M001, однако при

совместном введении комбинированное лечение оказалось более эффективным, чем у любого вводимого отдельно агента.

5 Статистический анализ (ANCOVA) объема опухолей на 6 неделе по данным, показанным на Фиг. 6с, показал, что лечение существенно уменьшало объем опухоли во всех группах, за исключением иринотекана и биспецифического антитела, содержащего MF3755 и MF5816. (Носитель по сравнению с MF3755 и MF5816, $p < 0,0001$; носитель по сравнению с иринотеканом, $p < 0,0001$; носитель по сравнению с иринотеканом + MF3755 и MF5816, $p < 0,0001$; MF3755 и MF5816 по сравнению с иринотеканом, $p < 0,6429$; MF3755 и MF5816 по сравнению с иринотеканом + MF3755 и MF5816, $p < 0,0001$; иринотекан + MF3755 и MF5816 по сравнению с иринотеканом, $p < 0,0001$.)

15 При комбинированном лечении M001 лечение не было более токсичным, чем при отдельном применении иринотекана. Что касается метастатического потенциала, антитело к EGFR/LGR5, содержащее MF3755 и MF5816, блокировало образование отдаленных метастаз, как и иринотекан. У мышей, получавших комбинацию иринотекана и биспецифического антитела к EGFR/LGR5, содержащего MF3755 и MF5816, метастазы не наблюдали.

20 В заключение, при использовании двух ортотопических опухолевых моделей KPP было обнаружено, что комбинированное лечение биспецифическим антителом к EGFR/LGR5, содержащим MF3755 и MF5816, и иринотеканом приводит к регрессии опухоли в большей степени по сравнению с введением этих лекарственных средств по отдельности. Кроме того, было обнаружено, что метастазы блокируются при лечении биспецифическим антителом к EGFR/LGR5, содержащим MF3755 и MF5816, и иринотеканом, как по отдельности, так и в комбинации.

25

№ PDX	LGR5	EGFR	Ядерный β-кат	APC	ГИБРИДЫ RSPO	RNF43	ZNRF3	KRAS	PIK3CA	TP53	MSI
MD05	1398,06	348,29	10 868	МУТ	ДГ	ДГ	ДГ	МУТ G13DS	МУТ	ДГ	ОТС
T108	4331,36	Н/П	Н/П	ДГ	МУТ	ДГ	ДГ	ДГ	ДГ	МУТ	Н/П
M001	5757,52	483,81	2501	ДГ	ДГ	ДГ	ДГ	МУТ G12D	МУТ	МУТ	Н/П

30 Таблица 1. Характеристики моделей PDX, производных от печеночных метастаз пациентов с KPP LGR5, EGFR и ядерный β-катенин определяли путем иммунофлуоресцентной количественной оценки. Статус мутации белков сигнализации Wnt (APC, RSPO, RNF43, ZNRF3) и онкогенных белков (KRAS, PIK3CA, TP53) определяли геномным анализом. Чувствительность моделей PDX (выращенных подкожно) к ингибиторам WNT указана в темных ячейках. Модель PDX T108 не использовали в дальнейших экспериментах.

Формула изобретения

1. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит
5 вариабельный домен, связывающийся с внеклеточным участком рецептора эпидермального
фактора роста (EGFR), и вариабельный домен, связывающийся с внеклеточным участком
сопряженного с G-белком рецептора, содержащего богатые лейцином повторы (LGR5), для
применения в лечении рака, причем антитело или его функциональный участок, производное и/или
аналог вводят с ингибитором топоизомеразы I.
- 10 2. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 1, причем рак
представляет собой колоректальный рак, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта или рак
яичника.
- 15 3. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, причем рак представляет собой колоректальный рак.
- 20 4. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, причем антитело или его функциональный участок, производное и/или
аналог и ингибитор топоизомеразы I вводят субъекту одновременно.
- 25 5. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, вводимые субъекту перед ингибитором топоизомеразы I.
- 30 6. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, причем VH-цепь вариабельного домена, который связывается с EGFR,
имеет аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8; или
аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, показанную на Фиг. 8, имеющую не более
15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3,
2 или 1 аминокислотной модификации, включая вставки, делеции, замены или их комбинацию, по
35 сравнению с указанной VH; и при этом VH-цепь вариабельного домена, который связывается с
LGR5, имеет аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, показанную на Фиг. 8; или
аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, показанную на Фиг. 8, имеющую не более
15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3,
2 или 1 аминокислотной модификации, включая вставки, делеции, замены или их комбинацию, по
сравнению с указанной VH.
- 40 7. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, причем вариабельный домен, связывающийся с LGR5, связывается с
эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 21–118 последовательности
человеческого LGR5, показанной на Фиг. 1.
- 45 8. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 7, причем
аминокислотные остатки в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 человеческого LGR5 участвуют в
связывании вариабельного домена, связывающегося с LGR5, с LGR5.
- 50 9. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 7 или 8, причем
вариабельный домен, связывающийся с LGR5, связывается меньше с белком LGR5, содержащим
одну или более вариаций аминокислотных остатков, выбранных из 43A, 44A, 46A, 67A, 90A и 91A.
- 10 10. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из
предшествующих пунктов, причем вариабельный домен, связывающийся с EGFR, связывается с

эпитопом, который расположен в пределах аминокислотных остатков 420–480 последовательности человеческого EGFR, показанной на Фиг. 2.

- 5 11. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 10, причем аминокислотные остатки в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 человеческого EGFR участвуют в связывании переменного домена, связывающегося с EGFR, с EGFR.
- 10 12. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 10 или 11, причем переменный домен, связывающийся с EGFR, связывается меньше с белком EGFR, содержащим одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из I462A, G465A, K489A, I491A, N493A и C499A.
- 15 13. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из предшествующих пунктов, причем ингибитор топоизомеразы I представляет собой камптотecin или его производное.
- 20 14. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из предшествующих пунктов, причем ингибитор топоизомеразы I представляет собой иринотекан или топотекан.
- 25 15. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из предшествующих пунктов, причем антитело имеет усиленную антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC).
- 30 16. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по любому из предшествующих пунктов, причем антитело является афукозилированным.
- 35 17. Способ ингибирования пролиферации клетки, которая экспрессирует EGFR и LGR5, в системе, допускающей пролиферацию клетки, причем способ включает обеспечение системы с ингибитором топоизомеразы I и антителом или его функциональным участком, производным и/или аналогом, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5.
- 40 18. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту, одновременно или последовательно, ингибитора топоизомеразы I и антитела или его функционального участка, производного и/или аналога, содержащего переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5.
- 45 19. Способ лечения рака по п. 18, причем рак представляет собой колоректальный рак, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта или рак яичника.
- 50 20. Способ лечения рака по п. 18, причем рак представляет собой колоректальный рак.
21. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; и ингибитор топоизомеразы I.
22. Фармацевтическая композиция по п. 21, причем антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с

внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; и ингибитор топоизомеразы I обеспечены в одном составе.

23. Фармацевтическая композиция по п. 22, причем антитело или его функциональный
5 участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; и ингибитор топоизомеразы I обеспечены в отдельных составах.
24. Набор, содержащий антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог,
10 которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5; ингибитор топоизомеразы I и инструкции по применению антитела и ингибитора топоизомеразы I при лечении по любому из пп. 1–16.
25. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит
15 переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, для применения в лечении рака желудочно-кишечного тракта у субъекта, причем антитело вводят одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором топоизомеразы I.
- 20 26. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, причем антитело вводят одновременно, отдельно или
25 последовательно с ингибитором топоизомеразы I.
27. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 26 для лечения колоректального рака, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта или рака яичника.
- 30 28. Антитело или его функциональный участок, производное и/или аналог по п. 27 для лечения колоректального рака.
29. Продукт, содержащий антитело или его функциональный участок, производное и/или
35 аналог, которое содержит переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком EGFR, и переменный домен, связывающийся с внеклеточным участком LGR5, и ингибитор топоизомеразы I, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении рака желудочно-кишечного тракта у субъекта.

Фиг. 1

	40	50	60
MDTSR LGVLL SLPVL LQLAT GGSSP RSGVL LRGCP THCHC EPDGR MLLRV DCSDL GLSEL			
	90	100	120
PSNLS VF TSY LDLSM NNISQ LLPNP LPSLR F LEEL RLAGN ALTYI PKGAF TGLYS LKVLN			180
LQNNQ LRHVP TEALQ NLRSL QSLRL DANHI SYVPP SCFSG LHSRL HLWLD DNALT EIPVQ			240
AFRSL SALQA MTLAL NKIHH IPDYA FGNLS SLVVL HLHNN RIHSL GKKCF DGLHS LETLD			300
LNYYN LDEFP TAIRT LSNLK ELGFH SNNIR SIPEK AFVGN PSLIT IHFYD NPIQF VGRSA			360
FQHLP ELRTL TLNGA SQITE FPDLT GTANL ESLTL TGAQI SSLPQ TVCNQ LPNLQ VLDLS			420
YNLLE DLPSF SVCQK LQKID LRHNE IYEIK VDTFQ QLLSL RSLNL AWNKI AIIHP NAFST			480
LPSLI KLDLS SNLLS SEFIT GLHGL THLKL TGNHA LQSLI SSENF PELKV IEMPY AYQCC			540
AFGVC ENAYK ISNQW NKGDN SSMDD LHKKD AGMFQ AQDER DLEDF LLDPE EDLKA LHSVQ			600
CSPSP GPFKP CEHLL DGWLI RIGVW TIAVL ALTCN ALVTS TVFRS PLYIS PIKLL IGVIA			660
AVNML TGVSS AVLAG VDAFT FGSFA RHGAW WENGV GCHVI GFLSI FASES SVFLL TLAAL			720
ERGFV VKYSA KFETK APFSS LKVII LLCAL LALTM AAVPL LGGSK YGASP LCLPL PFGEF			780
STMGY MVALI LLNSL CFLMM TIAYT KLYCN LDKGD LENIW DCSMV KHIAL LLFTN CILNC			840
PVAFV SFSSL INLTF ISPEV IKFIL LVVVP LPACL NPLLY ILFNP HFKEF LVSLR KQTYV			900
WTRSK HPSLM SINSF DVEKQ SCDST QALVT FTSSS ITYDL PPSSV PSPAY PVTEF CHLSS			
VAFVP CL			

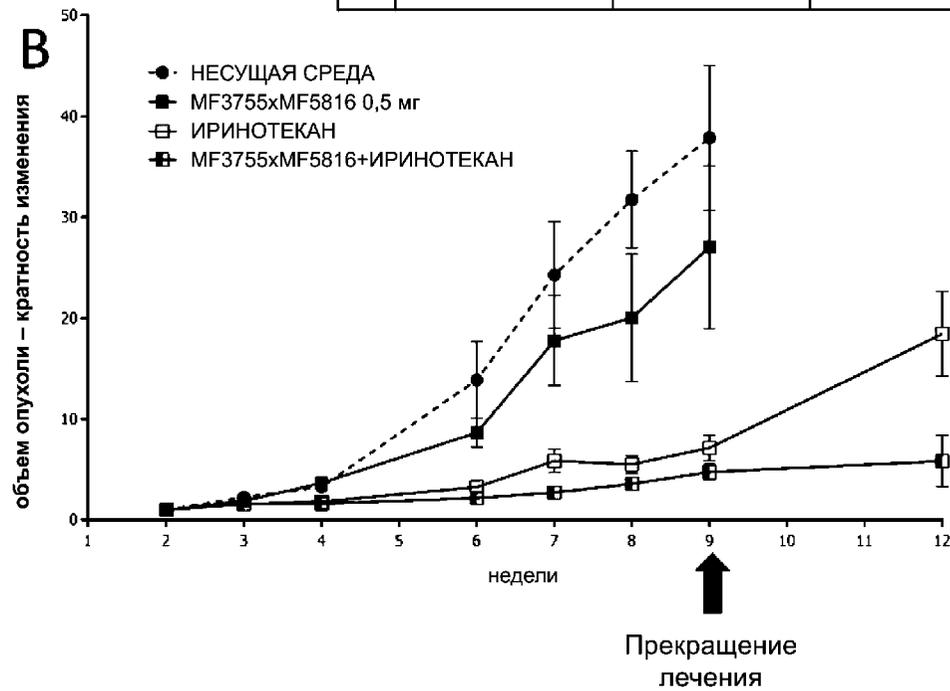
Фиг. 2

					30		40		50
MRPSG	TAGAA	LLALL	AALCP	ASRAL	EEKKV	CQGTS	NKLTQ	LGTFE	DHFLS
									100
LQRMF	NNCEV	VLGNL	EITYV	QRNYD	LSFLK	TIQEV	AGYVL	IALNT	VERIP
LENLQ	IIRGN	MYYEN	SYALA	VLSNY	DANKT	GLKEL	PMRNL	QEILH	GAVRF
									200
SNNPA	LCNVE	SIQWR	DIVSS	DFLSN	MSMDF	QNHLG	SCQKC	DPSCP	NGSCW
GAGEE	NCQKL	TKIIC	AQQCS	GRCRG	KSPSD	CCHNQ	CAAGC	TGPRE	SDCLV
									300
CRKFR	DEATC	KDTCP	PLMLY	NPTTY	QMDVN	PEGKY	SFGAT	CVKKC	PRNYV
VTDHG	SCVRA	CGADS	YEMEE	DGVRK	CKKCE	GPCRK	VCNGI	GIGEF	KDLSL
									400
INATN	IKHFK	NCTSI	SGDLH	ILPVA	FRGDS	FTHTP	PLDPQ	ELDIL	KTVKE
ITGFL	LIQAW	PENRT	DLHAF	ENLEI	IRGRT	KQHGG	FSLAV	VSLNI	TSLGL
									500
RSLKE	ISDGD	VIISG	NKNLC	YANTI	NWKKL	FGTSG	QTKI	ISNRG	ENSCK
ATGQV	CHALC	SPEGC	WGPEP	RDCVS	CRNVS	RGREC	VDKCN	LLEGE	PREFV
									600
ENSEC	IQCHP	ECLPQ	AMNIT	CTGRG	PDNCI	QCAHY	IDGPH	CVKTC	PAGVM
GENNT	LVWKY	ADAGH	VCHLC	HPNCT	YGCTG	PGLEG	CPTNG	PKIPS	IATGM
									700
VGALL	LLLIV	ALGIG	LFMRR	RHIVR	KRTLRL	RLLQE	RELVE	PLTPS	GEAPN
QALLR	ILKET	EFKKI	KVLGS	GAFGT	VYKGL	WIPEG	EKVKI	PVAIK	ELREA
									800
TSPKA	NKEIL	DEAYV	MASVD	NPHVC	RLGLI	CLTST	VQLIT	QLMPF	GCLLD
YVREH	KDNIG	SOYLL	NWCVQ	IAKGM	NYLED	RRLVH	RDLAA	RNVLV	KTPQH
									900
VKITD	FGLAK	LLGAE	EKEYH	AEGGK	VPIKW	MALES	ILHRI	YTHQS	DVWSY
GVTVW	ELMTF	GSKPY	DGIPA	SEISS	ILEKG	ERLPQ	PPICT	IDVYM	IMVKC
									1000
WMIDA	DSRPK	FRELI	IEFSK	MARDP	QRYLV	IQGDE	RMHLP	SPTDS	NFYRA
LMDEE	DMDDV	VDADE	YLIPQ	QGFFS	SPSTS	RTPLL	SSLSA	TSNNS	TVACI
									1100
DRNGL	QSCPI	KEDSF	LQRYV	SDPTG	ALTED	SIDDT	FLPVP	EYINQ	SVPKR
PAGSV	QNPVY	HNQPL	NPAPS	RDPHY	QDPHS	TAVGN	PEYLN	TVQPT	CVNST
									1200
FDSPA	HWAQK	GSHQI	SLDNP	DYQQD	FFPKE	AKPNG	IFKGS	TAENA	EYLRV
APQSS	EFIGA								

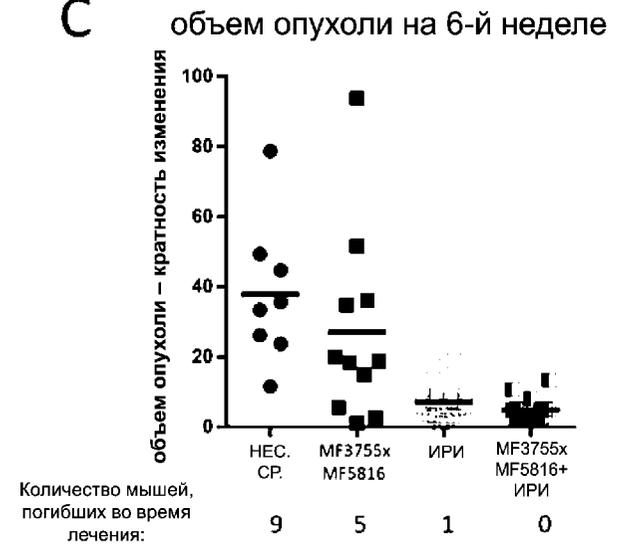
Фиг. 3

A

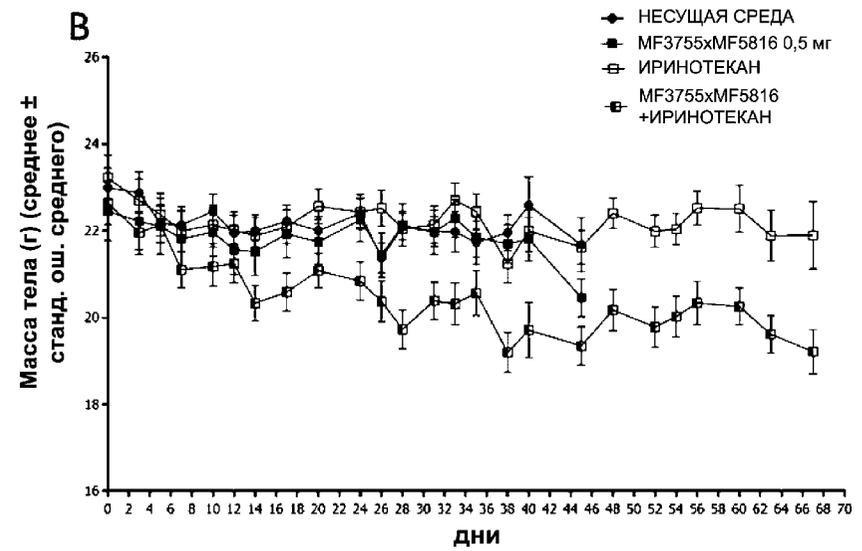
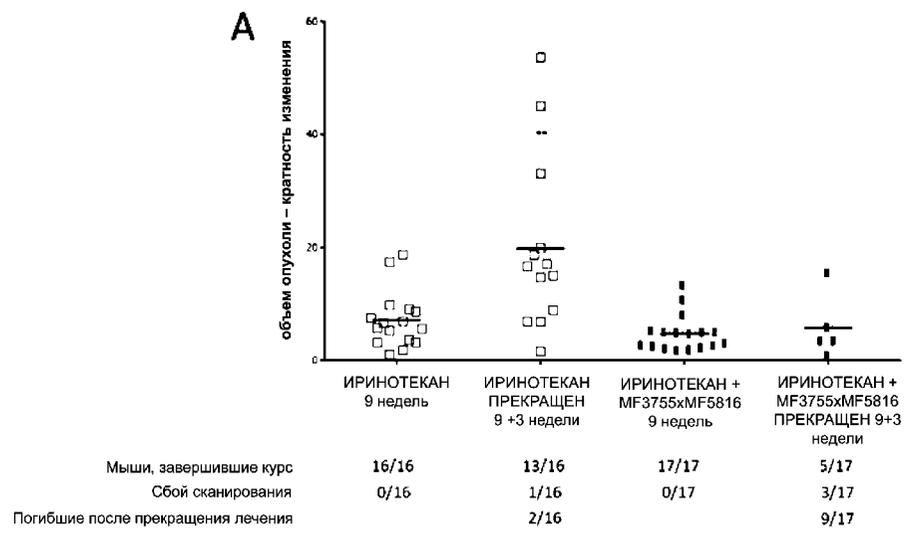
Экспериментальные группы		Несущая среда	MF3755xMF5816	Иринотекан
	1. Несущая среда	100 мкл перорально; PBS; один раз в неделю		
	2. MF3755xMF5816		100 мкл, в/б; 0,5 мг/мышь; один раз в неделю	
	3. Иринотекан			50 мкл, в/б; 50 мг/кг один раз в неделю
	4. MF3755xMF5816+ иринотекан		100 мкл, в/б; 0,5 мг/мышь; один раз в неделю	50 мкл, в/б; 50 мг/кг один раз в неделю



C



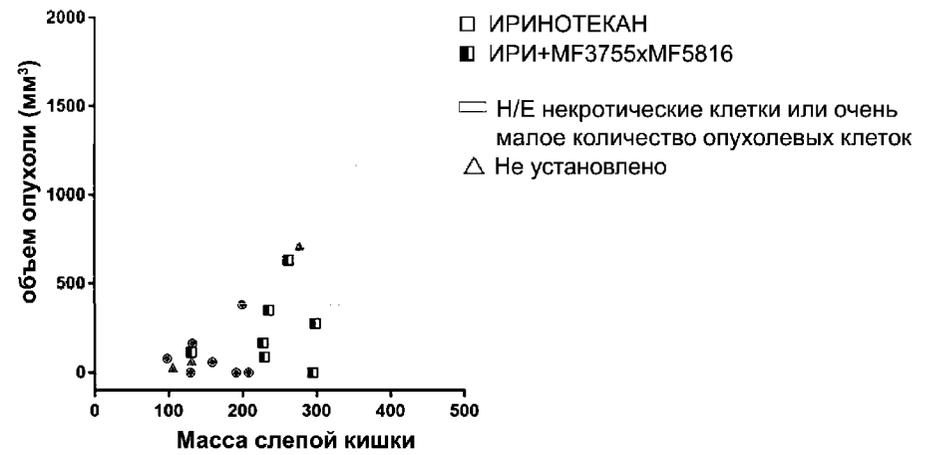
Фиг. 4



Фиг. 5

ЛЕЧЕНИЕ	ВСЕГО МЫШЕЙ	МЫШИ С МЕТАСТАЗАМИ		
		КАРЦИНОМАТОЗЫ	ЛЕГКОЕ	ПЕЧЕНЬ
Несущая среда	14	3	3	0
Иринотекан	13	0	1	0
MF3755xMF5816	14	1	0	0
MF3755xMF5816 + Иринотекан	15	0	0	0

А

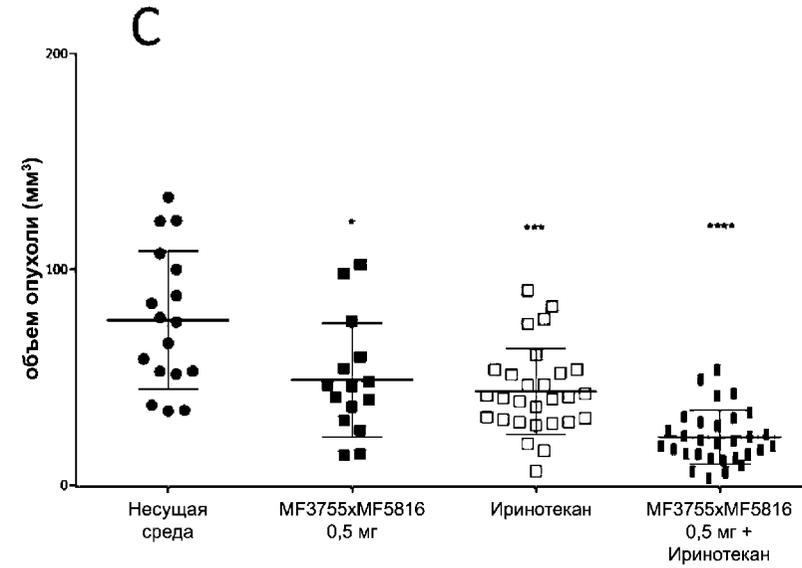
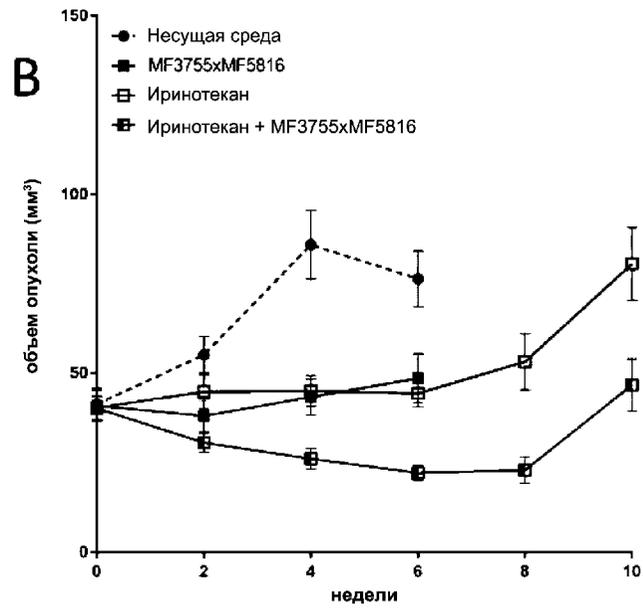


В

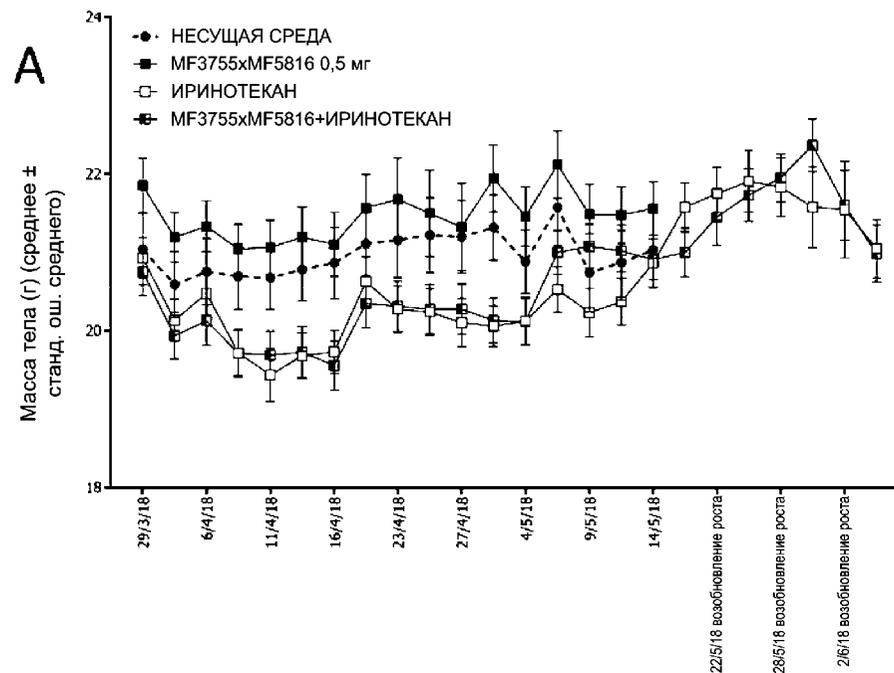
Фиг. 6

A

Соединение	Несущая среда	Объем и способ	Доза (мг/кг)	Схема
Несущая среда (18 мышей)	PBS	100 мкл в/б	-	Один раз в неделю
MF3755xMF5816 (18 мышей)	PBS	100 мкл в/б	0,5 мг/мышь	Один раз в неделю
Иринотекан (33 мыши)	готово к использованию	50 мкл в/б	50 мг/кг	Один раз в неделю
MF3755xMF5816 + иринотекан (33 мыши)	как указано выше	как указано выше	как указано выше	Один раз в неделю



Фиг. 7



B

ЛЕЧЕНИЕ	ВСЕГО МЫШЕЙ	НА ЛЕЧЕНИИ			ВСЕГО МЫШЕЙ	ПРЕКРАЩЕНИЕ ЛЕЧЕНИЯ		
		МЫШИ С МЕТАСТАЗАМИ				МЫШИ С МЕТАСТАЗАМИ		
		КАРЦИНОМАТОЗЫ	ЛЕГКОЕ	ПЕЧЕНЬ		КАРЦИНОМАТОЗЫ	ЛЕГКОЕ	ПЕЧЕНЬ
Несущая среда	18	10	2	3	0	x	x	x
MF3755xMF5816	18	3	0	0	0	x	x	x
Иринотекан	15	0	0	0	13	2	0	0
MF3755xMF5816 + Иринотекан	17	0	0	0	15	1	0	0

Фиг. 8

а)

1337	TT	IGVH1-08	EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTRKYDINWVRQAPGQGLEWMGMSANTGNTGYAQRKRFQGRVTMTTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTIETAPYYHPALDVGQGTITVTVSS
3370	EGFR	IGVH1-18	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHWLLDAFDYWGQGTITVTVSS
3755	EGFR	IGVH7-4-1	QVQLVQSGSELKRPASVKISCKASGYDFTNYAMNWRQAPGHGLEWMGWINANTGDPITYAQGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAEEDSAVYYCTRERFLEWLFHFDYWGQGTITVTVSS
4280	EGFR	IGVH1-24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSQYTLTELSMHWRQAPGKGLEWMGGFDPEYGRKTFPAQNFQGRVTMTEDTSGADTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEGYYETTTYYNLPDSWGQGTITVTVSS
4289	EGFR	IGVH7-4-1	QVQLVQSGSELKRPASVKVSKTSGYTFDYMNTWRQAPGQGLEWMGWITNTGDPITYAPGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCARVYHWRGFEFWGQGTITVTVSS
5790	LGR5	IGVH4-39	QVQLQESGPGLVKPSETLSLICTVSGGSSSSSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYINPSLKSRTVISEDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARQTYSSSWDGVLYYFDYWGQGTITVTVSS
5803	LGR5	IGVH4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLICTVSNGLISTYYWVIRQPPGKGLEWIGYVYVYTGRIKYNPSLKSRTVISEDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARGGIIVVYPAARDYIYMDVWVGKGTITVTVSS
5805	LGR5	IGVH5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKSGGFSFTSHWIGWVRQRPGRGLEWMGVYIPGDSDFRYSPSPQGGVTVSADKSNITAYLQWNSLKASDTAIYYCARPNSSGSPRYPEFWGRGLVTVSS
5808	LGR5	IGVH4-39	QVQLQESGPGLVKPSETLSLICTVSGGSSSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYINPSLKSRTVISEDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARQEYIYSGSPPSYFDYWGQGTITVTVSS
5809	LGR5	IGVH5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKSGGDSFISHWIAWVRQMPGKGLEWMGVYIPGDSDFRYSPSPQGGVTVSADKSNITAYLQWNSLKASDTAMYYCARHEWELLPDFDYWGQGTITVTVSS
5814	LGR5	IGVH1-69	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTSTNDAIWVVRQIPGQGLEWMGSIIPILDTIDHAQKRFQGRVTITADKSNITAYMELNSLRSDDTAVYYCAREHIAARQDYFDYWGQGTITVTVSS
5816	LGR5	IGVH7-4-1	EVQLVQSGSKLKPASVKVSCKASGYTFTSYTMNWRQAPGQGLEWMGWINTGDPITYAQGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQINSLKAEEDTAVYYCARGDCDSTSCYRYSYGYEDYWGQGTITVTVSS
5817	LGR5	IGVH1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSQGTFRSYAIWVVRQAPGQGLEWMGSIIPILDTIDHAQKRFQGRVTITADLSTAYMELNSLRSEDTAIYYCARGSDGDFDPWGQGTITVTVSS
5818	LGR5	IGVH1-69	EVQLVQSGTEVRRKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAIWVVRQAPGQGLEWMGSIIPILDTIDHAQKRFQGRVTITADKSSNTYMLSSLRSDDTAVYYCAREYIAARLDYFDSWGQGTITVTVSS

b)

1337	TT	IGVH1-08	EVQLVETGAEVKKKPGASVKVSCKASDYIFT	KYDIN	WVRQAPGQGLEWMG	WMSANTIGNTGYAQKFGG	RVTMIRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCAR	SSLFKTETAPYYHFALDV	WGQGTITVTVSS
3370	EGFR	IGVH1-18	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFT	SYGIS	WVRQAPGQGLEWMG	WISAYNGNTNYAQKLGQ	RVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAK	DRHWHWWLDAFDY	WGQGTITVTVSS
3755	EGFR	IGVH7-4-1	QVQLVQSGSELKKKPGA SVKISCKASGYDFT	NYAMN	WVRQAPGHGLEWMG	WINANTGDPITYAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTR	ERFLEWLHFDY	WGQGTITVTVSS
4280	EGFR	IGVH1-24	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKVSGYTLT	ELSMH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDPEYGKTFPAQNFQG	RVTMTEDTSADTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	EGYYETTTYYNLFDS	WGQGTITVTVSS
4289	EGFR	IGVH7-4-1	QVQLVQSGSELKKKPGASVKVSCKTSGYIFT	DYAMT	WVRQAPGQGLEWMG	WITITNGDPTIYAPGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	VYHWIRGFEE	WGQGTITVTVSS
5790	LGR5	IGVH4-39	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSFS	SSSSYWG	WIRQPPGKGLEWIG	SFYYSGNTYYNPSLKS	RVTISEDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	QTYSSSWDGVLYYFDY	WGQGTITVTVSS
5803	LGR5	IGVH4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGLSIS	IYYNS	WIRQPPGKGLEWIG	YVYYTGRTKYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCAR	GGIVVVAARDYVYVMDV	WGKGTITVTVSS
5805	LGR5	IGVH5-51	EVQLVQSGAEVKKKPE SLKIA CKGSGFSFT	SHWIG	WVRQKPRGLEWMG	VIYPGDSDTRYSPSFQG	QVTVSADKSINTAYLQWNSLKA SDTAVYYCAR	PNSGSPRYFEF	WGRGTLVTVSS
5808	LGR5	IGVH4-39	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS	SSSSYWG	WIRQPPGKGLEWIG	SFYYSGNTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	QYYYGSGSPSYFFDY	WGQGTITVTVSS
5809	LGR5	IGVH5-51	EVQLVQSGAEVKKKPE SLKISCKGSGDSFI	SHWIA	WVRQMPGKGLEWMG	IVYPGDSDTRYSPSFQG	QVTVSADKSITAYLQWNSLKA SDTAVYYCAR	HEWELGPFDF	WGQGTITVTVSS
5814	LGR5	IGVH1-69	EVQLVQSGAEVKKKPGS SVKVSCKASGGTST	NDAIS	WVRQIPGQGLEWMG	SIIPILDITDHAQKFGG	RVTITADKSINTAYMELNSLRSDDTAVYYCAR	EHIARQDYFDY	WGQGTITVTVSS
5816	LGR5	IGVH7-4-1	EVQLVQSGSKLKKPGA SVKVSCKASGYTFT	SYTMN	WVRQAPGQGLEWMG	WINTDIGDPIYAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAFQINS LKAEDTAVYYCAR	GDCDSISCYRYSYG YEDY	WGQGTITVTVSS
5817	LGR5	IGVH1-69	QVQLVQSGAEVKKKPGS SVKVSCKVSGGIFR	SYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIIPIFDTRNYAQILQG	RVTITADLSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCAR	GSDEGDWFDPE	WGQGTITVTVSS
5818	LGR5	IGVH1-69	EVQLVQSGTEVRRKPGS SVKVSCKASGGTFS	NYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	SIIPILGTTDHAQKFGD	RVTITADKSSNTYME LSSLRSDDTAVYYCAR	EYIARLDYFDS	WGQGTITVTVSS

c)

MF1337:

gaggtgcagctggtgggagactggggctgaggtgaagaagccggggcctcagtggaaggtctcctgcaagg
cttctgactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgaatg
gatgggatggatgagcgcctaactggaaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctgggtgacacggccgttt
atctctgtgagaggagtagtcttttcaagacagagacggcgccctactatacttctgctctggagctctg
ggccaagggaccacgggtcaccgtctccagt

MF3370:

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtctcctgcaagg
cttctgggttacacctttaccagctatggatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgaatg
gatgggatggatcagcgccttacaatggtaacacaaaactatgcacagaagctccagggcagagtcaccatg
accacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaaaagatcgtcattggcattggtggctggacgcctttgattattggggccaaggtaccct
ggtcaccgtctccagt

MF3755:

caggtgcagctggtgcagctctgggtctgagttgaagaagcctggggcctcagtggaagattctcctgcaagg
cttctgggatacgaacttcactaactatgctatgaattgggtgcgacaggccccctggacacgggcttgaatg
gatgggatggatcaacgccaactggggacccaacgtatgccagggcttcacaggacggtttgtcttc
tccttggacacctctgtcagcagcgcataatctgcagatcagcagtttaaaggetgaggactctgccgtgt
attactgtacgagagagcgatttttggagtgggttacactttgactactggggccagggaaacctgggtcac
cgtctccagt

MF4280:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtctcctgcaagg
tttccggatacacacctcactgaattatccatgactgggtgcgacaggctcctggtaaagggcttgaatg
gatgggagggctttgatcctgagatggtaaaacattcttcgacagaacttcacagggcagagtcaccatg
accgaggacacatctgcagacacagcctacatggagctaaagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaacagaggggtattatgagactactacttattactacaaccttttggactcctggggcca
gggaacctgggtcaccgtctccagt

MF4289:

caggtgcagctggtgcaatctgggtctgaattgaagaagcctggggcctcagtggaaggtttcctgcaaga
cttctgggatacacacctcactgactatgctatgacttgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgaatg
gatgggatggatcaccaccaactggggacccaacgtatgcccgggcttcacaggacggtttgtcttc
tccttggacacctctgtcagcagcgcataatctgcagatcagcagcctaaagggcagggacactgccgtat
attactgtgagagagtgatcattggatacggggatttgagttttggggccagggaaacctgggtcaccgt
ctccagt

MF5790:

caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcgggagaccctgtccctcacctgcactg
tctctgggtggctccttcagcagtagtagttcctactggggctggatccgccagccccagggaaagggct
ggagtgattgggagtttctattatagtggaacacctactacaacctgcctcaagagtcgagtcacc
atatccgaagacacgtccaagaaccagttctcctgaagctgagctctgtgaccgccgacacagcgtg
tgtattactgtgagagacagacgtatagcagcagctgggacggggctcctgtactactttgactactgggg
ccagggaaacctgggtcaccgtctccagt

MF5803:

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactg
 tctctaattggctccatcagtaacttaactactggagctggatccggcagccccaggggaagggctggagtg
 gattggatatgtctattacactggggcgaccaagtacaaccctccctcaagagtcgagtcaccatatca
 gtagacacgtccaagaaccagttctccctgaacctgagttctgtgaccgctgcggaacacggccgtgtatt
 actgtgcgagaggggtattgtagtagtcccagctgcgcgggactattactactacatggacgtctgggg
 caaagggaccacggtcaccgtctccagt

MF5805:

gaggtgcaactggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagccccggggagctctctgaagatcgctgtaagg
 gttctggattcagttttaccagccactggatcgctgggtgcgccagaagccccgggagagggcctggagtg
 gatgggggtcatctatcctgggtgactctgataccagatacagcccgtccttccaagggccaggtcaccgtc
 tcagccgacaagtccatcaataccgctactctgcagtggaaacagcctgaaggcctcggacacccgcatat
 attactgtgagacacgaacagtgagggtccccggtacttcgagttctggggccgtggcacccctggtcac
 cgtctccagt

MF5808:

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactg
 tctctgggtggctccatcagcagtagtagttaactactggggctggatccggcagccccaggggaagggct
 ggagtgattggggagtttctattatagtggaacacctactacaaccctccctcaagagtcgagtcacc
 atatccgtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgcccagacacggctg
 tgtattactgtgagacagggatattactatggttcggggagtccttctgtaactactttgactactgggg
 ccagggaaacctgggtcaccgtctccagt

MF5809:

gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagccccggggagctctctgaagatctcctgtaagg
 gttctggagacagttttatcagccactggatcgctgggtgcgccagatgccccgggaaagggcctggagtg
 gatggggatcgtctatcctgggtgactctgataccagatacagcccgtccttccaagggccaggtcaccatc
 tcagccgacaagtccatcaccaccgctactctgcagtggagcagcctgaaggcctcggacacccgcatgt
 attactgtgagacacagagtggaactacttgccccctttgactactggggccagggaaacctggtcac
 cgtctccagt

MF5814:

gaggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggagggcacctccactaacgatgctatcagttgggtgcgacagccccctggacaagggccttgagtg
 gatgggaagtatcatccctatccttgatacaacagaccacgcacagaagttccagggcagagtcacgatt
 accgcccgaacaatccacgaacacagcctacatggagctgaacagcctgagatctgatgacacggccgtgt
 attactgtgagagagacatagcagctcgtcaggactactttgactattggggccagggaaacctggt
 caccgtctccagt

MF5816:

gaggtgcagctggtgcagctctgggtctaaattgaagaagcctggggcctcagtggaaggtttcctgcaagg
 cttctggatacaccttcactagctatactatgaattgggtgcgacagggccccctggacaagggccttgagtg
 gatgggatggatcaacaccgacactggggacccaacgtatgccagggcttcacaggacggtttgtcttc
 tccttgacacctctgtcagcagggcatttctacagatcaacagcctaaagggctgaggacactgccgtat
 attactgtgagagagagattgtgatagtagcagctgctatagatacagttatggttacaggagactctg
 gggccagggaaacctggtcaccgtctccagt

MF5817:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagg
 tttctggagggcaccttcaggagctatgctatcagctgggtgcgacagggccccctggacaagggccttgagtg

gatgggagggatcatccctatctttgatacaagaaactacgcacagattcttcagggcagagtcacgatt
accgoggacttatccacgagcacagcctacatggagctgaacagtctgagatctgaggacacggccattt
attactgtgagagagggagcgcgagggggactggttcgacccctggggccaaggaaccctggtcaccgt
ctccagt

MF5818:

gaggtgcagctgggtgcagctctgggactgaggtgaggaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagg
cttctggaggcaccttcagcaactatgctatcagctgggtgagacaggccctggacaggggcttgagtg
gatgggaagtatcatccctatccttggaaacaacagaccacgcacagaagttccaggacagagtcacgatt
accgoggacaaatcctcgaacacaacctacatggagctgagcagcctgagatctgatgacacggccgtat
attactgtgagagaggtatatagcagctcgtctggactactttgactcttggggccaggaaccctgg
caccgtctccagt

Фиг. 9

a)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

b)

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

c)

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 ggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 tggaaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaag
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 agcttcaacaggggagagtgtag
 S F N R G E C -

d)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
 SSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

e)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
 SSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

f)

CDR1 - QSISSY,
 CDR2 - AAS
 CDR3 - QQSYSTRPPT
 в соответствии с IMGT

Фиг. 10

a)

CH1:

gctagcaccsaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 ggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctg
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 tggaaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctca
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 tacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaaacaccaaggtggacaagagagtt
 Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

b)

Шарнир:

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

c)

CH2:

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacacc
 A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
 ctcatgatctccccggaccctgaggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagac
 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
 ccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagcc
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
 P I E K T I S K A K

d)

CH3: L351K и T366K

```

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

```

e)

CH3: L351D и L368K

```

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

```