

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292682** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.02.03

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

(22) Дата подачи заявки
2021.04.23

(54) **ЛЕЧЕНИЕ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АНТИТЕЛОМ, СВЯЗЫВАЮЩИМ LGR5 И EGFR**

(31) **2025425**

(32) **2020.04.24**

(33) **NL**

(86) **PCT/NL2021/050267**

(87) **WO 2021/215926 2021.10.28**

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Вассерман Эрнесто Айзек, Бол
Корнелис Якоб Йоханнес Джордж,
Фатрай Сабольч (NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к средствам и способам лечения рака. Изобретение, в частности, относится к способу лечения рака у индивидуума антителом, связывающим LGR5 и EGFR. Изобретение также относится к комбинации для применения в таких способах и к комбинации для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения рака желудочно-кишечного тракта. Такие антитела особенно эффективны в лечении рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода.

202292682

A1

A1

202292682

ЛЕЧЕНИЕ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АНТИТЕЛОМ, СВЯЗЫВАЮЩИМ LGR5 И EGFR

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Изобретение относится к средствам и способам лечения рака. Изобретение, в частности, относится к способу лечения рака у индивидуума антителом, связывающим LGR5 и EGFR. Изобретение также относится к комбинации для применения в таких способах и к комбинации для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения рака желудочно-кишечного тракта. Такие антитела особенно эффективны при лечении
10 рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Традиционно большинство исследований в области лекарственных средств для лечения рака было сосредоточено на агентах, которые блокируют основные функции
15 клеток и уничтожают делящиеся клетки посредством химиотерапии. Однако химиотерапия редко приводит к полному излечению. В большинстве случаев опухоли у пациентов перестают расти или временно уменьшаются (это называется ремиссией), но затем снова не начинают пролиферировать, иногда с большей скоростью (это называется рецидивом), и все хуже поддаются лечению. В последнее время основное
20 внимание при разработке лекарственных средств для лечения рака сместилось от химиотерапии с широким спектром цитотоксического действия к методам таргетной цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение рака поздней стадии таргетной терапией, которая специфично ингибирует компоненты сигнального пути, было клинически валидировано при лейкозе. Однако при большинстве карцином
25 таргетные подходы все еще оказываются неэффективными.

Рак по-прежнему является основной причиной смерти в мире, несмотря на многочисленные успехи в лечении этого заболевания и расширение знаний о молекулярных процессах, ведущих к раку. Рак желудка, например, занимает 5 место
30 среди наиболее часто диагностируемых раковых заболеваний в мире и 3 место по смертности от рака. Согласно оценкам, в 2018 году от рака желудка умерло 783000 человек. Рак пищевода занимает 9 место среди наиболее распространенных видов рака и 6 место по смертности от рака. Сообщалось, что рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) сверхэкспрессируется более чем в 30% случаев аденокарциномы желудка
35 (GAC) и аденокарциномы пищевода (EAC). Однако анализ шести различных исследований показал, что добавление анти-EGFR агента к химиотерапии не улучшало общую выживаемость или выживаемость без прогрессирования у пациентов

с распространенным/метастатическим ЕАС, ГАС или аденокарциномой пищеводно-желудочного перехода (GEJAC) (Kim et al. 2017 Oncotarget. 2017 Nov 17; 8(58): 99033–99040). Таким образом, существует потребность в методах лечения рака, в частности, в методах лечения рака желудка и пищевода.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно изобретению предложены следующие предпочтительные варианты осуществления. Однако изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления.

10

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака у субъекта, где указанное применение включает введение субъекту фиксированной дозы 1500 мг указанного антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. Согласно изобретению также предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту фиксированной дозы 1500 мг антитела или его функциональной части, производного и/или аналога.

15

20

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта. Согласно изобретению также предложены способы лечения рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. Предпочтительно указанное применение включает введение субъекту фиксированной дозы 1500 мг антитела или его функциональной части, производного и/или аналога.

25

30

В некоторых вариантах осуществления введения терапевтического соединения могут осуществляться еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение вводят один раз каждые 2 недели.

35

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта с Her2-отрицательным статусом. Согласно изобретению также предложены способы лечения рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта с Her2-отрицательным статусом, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. Предпочтительно указанное применение включает введение субъекту фиксированной дозы 1500 мг антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. В некоторых вариантах осуществления введения терапевтического соединения субъекту с Her2-отрицательным статусом могут осуществляться еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Предпочтительно терапевтическое соединение вводят один раз каждые 2 недели.

Предпочтительно антитело или его функциональную часть, производное и/или аналог вводят внутривенно.

Предпочтительно рак имеет мутацию в одном или более генах, выбранных из TP53, MLH1, PIK3CA, CDKN2A, UGT1A, UGT1A8, BRAF, PTEN и KRAS, предпочтительно где рак имеет мутацию в одном или более генах, выбранных из TP53, MLH1, CDKN2A, UGT1A, UGT1A8, BRAF и PTEN. Предпочтительно рак имеет одну или более мутаций, выбранных из TP53 R196T; TP53 R342T; TP53 R248Q; MLH1 V384D; PIK3CA H1047R; CDKN2A W110T; UGT1A1 G71R; UGT1A8 G71R; и KRAS G12C.

Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R196T. Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R342T, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем MLH1, где мутация предпочтительно представляет собой V384D.

Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R248Q, рак имеет мутацию в гене, кодирующем PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой H1047R, рак имеет мутацию в гене, кодирующем CDKN2A, где мутация предпочтительно представляет собой W110T, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.

Предпочтительно рак представляет собой рак пищевода, предпочтительно плоскоклеточную карциному пищевода (ESCC).

- 5 Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем BRAF. Однако предпочтительно рак не имеет мутации V600E в BRAF, и при этом рак имеет мутацию в гене, кодирующем PTEN. Однако предпочтительно рак также не имеет мутации R130Ter в PTEN.
- 10 Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем KRAS, где мутация предпочтительно представляет собой G12C, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.
- 15 Предпочтительно рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R. Предпочтительно рак дополнительно имеет мутацию в PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой E545K.
- 20 Предпочтительно рак представляет собой рак желудка.

- Предпочтительно VH-цепь вариабельного домена, связывающего EGFR, содержит аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или
- 25 аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, включая инсерции, делеции, замены или их комбинацию, относительно указанной VH; и где VH-цепь вариабельного домена, связывающего LGR5, содержит аминокислотную
- 30 последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, включая инсерции, делеции, замены или их комбинацию, относительно указанной VH.

- 35 Предпочтительно вариабельный домен, связывающий LGR5, связывает эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности LGR5

человека, представленной на фиг. 1. Предпочтительно аминокислотные остатки в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 LGR5 человека участвуют в связывании LGR5-связывающего переменного домена с LGR5. Предпочтительно LGR5-связывающий переменный домен в меньшей степени связывается с белком LGR5, содержащим одну или более вариаций аминокислотных остатков, выбранных из 43А, 44А, 46А, 67А, 90А и 91А.

Предпочтительно переменный домен, связывающий EGFR, связывает эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 420-480 последовательности EGFR человека, представленной на фиг. 2. Предпочтительно аминокислотные остатки в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 EGFR человека участвуют в связывании EGFR-связывающего переменного домена с EGFR. Предпочтительно EGFR-связывающий переменный домен в меньшей степени связывается с белком EGFR, содержащим одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из I462А, G465А, K489А, I491А, N493А и C499А.

Предпочтительно антитело характеризуется повышенной АЗКЦ (антителозависимая клеточная цитотоксичность). Предпочтительно антитело является афукозилированным.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Последовательность LGR5 человека; Идентификационный № последовательности: 1.

Фиг. 2. Последовательность EGFR человека; Идентификационный № последовательности: 2.

Фиг. 3 (а). Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи (идентификационные № последовательностей: 3-15), которые вместе с переменной областью общей легкой цепи, такой как переменная область легкой капша-цепи человека IgV_κ1 39*01/IGJ_κ1*01, образуют переменный домен, связывающий LGR5 и EGFR. CDR и каркасные области представлены на фиг. 3б. Соответствующие последовательности ДНК представлены на фиг. 3с.

Фиг. 4 а). Аминокислотная последовательность аминокислотной последовательности общей легкой цепи. б) Последовательность ДНК и трансляция переменной области общей легкой цепи (IGKV1-39/jk1). с) Последовательность ДНК и трансляция

константной области легкой цепи. d) V-область IGKV1-39A; e) CDR1, CDR2 и CDR3 общей легкой цепи в соответствии с нумерацией IMGT.

Фиг. 5. Тяжелые цепи IgG для получения биспецифичных молекул. а)

- 5 Последовательность ДНК и трансляция области CH1. б) Последовательность ДНК и трансляция шарнирной области. в) последовательность ДНК и трансляция области CH2. д) Последовательность ДНК и трансляция домена CH3, содержащего вариации L351K и T366K (KK). е) Последовательность ДНК и трансляция домена CH3, содержащего вариации L351D и L368E (DE). Позиции остатков соответствуют нумерации EU.
- 10

Фиг. 6. Данные отражают средний размер опухоли в а) PDX-моделях желудка и б)

- PDX-моделях пищевода, планки погрешностей представляют собой SEM. Для расчета статистической значимости в отдельно взятой временной точке использовали двухфакторный дисперсионный анализ. ADC = аденокарцинома. SCC = плоскоклеточная карцинома. Серые области представляют собой период лечения.
- 15

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

- 20 Для облегчения понимания настоящего описания сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены по всему тексту подробного описания изобретения. Если в настоящем документе отдельно не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники,
- 25 и используются обычные методы иммунологии, химии белков, биохимии, технологии рекомбинантных ДНК и фармакологии.

В настоящем документе формы единственного числа включают термины во множественном числе. Использование термина «содержащий», «имеющий»,

- 30 «включающий», а также других форм, таких как «содержать», «содержит», «содержал», «имеет», «иметь», «имел», «включать», «включает» и «включал», не имеет ограничительного характера.

Термин «антитело» в настоящем документе означает белковую молекулу,

- 35 принадлежащую к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более доменов, которые связывают эпитоп на антигене, где такие домены представляют собой переменную область антитела, или получены из нее, или обладают с ней гомологией

последовательности. Антитела обычно состоят из основных структурных единиц – каждое из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Антитело согласно настоящему изобретению не ограничивается каким-либо определенным форматом или способом его получения.

5

«Биспецифичное антитело» представляет собой антитело, описанное в настоящем документе, в котором один домен антитела связывается с первым антигеном, тогда как второй домен антитела связывается со вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены не являются идентичными, или где один домен связывает первый

10

эпитоп на антигене, а второй домен связывает второй эпитоп на антигене. Термин «биспецифичное антитело» также охватывает антитела, в которых одна комбинация вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи (VH/VL) связывает первый антиген или эпитоп на антигене, а вторая комбинация VH/VL связывает второй антиген или эпитоп на антигене. Данный термин также включает

15

антитела, в которых VH способна специфично распознавать первый антиген, а VL, спаренная с VH в вариабельной области иммуноглобулина, способна специфично распознавать второй антиген. Полученная пара VH/VL будет связывать либо антиген 1, либо антиген 2. Такие так называемые «антитела два в одном» описаны, например, в публикации WO 2008/027236, WO 2010/108127 и источнике Schaefer et al (Cancer Cell

20

20, 472-486, октябрь 2011 г.). Биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению не ограничивается каким-либо определенным биспецифичным форматом или способом его получения.

25

Термин «общая легкая цепь» в настоящем документе относится к двум легким цепям (или их VL-части) в биспецифичном антителе. Две легкие цепи (или их VL-часть) могут быть идентичными или иметь некоторые различия в аминокислотной

30

последовательности, при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не изменяется. Термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одионочная легкая цепь», «одионочная VL», с добавлением термина «перестроенная» или без него, используются в настоящем документе взаимозаменяемо. «Общий» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не является

35

идентичной. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, инсерции и/или добавления), не влияющие на образование функциональных областей связывания. Легкая цепь согласно настоящему изобретению также может представлять собой легкую цепь, как указано в настоящем документе, имеющую от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, добавлений, или их комбинацию. Например, в объеме

данного определения общих легких цепей в настоящем документе входит получение или поиск легких цепей, которые не являются идентичными, но при этом функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных аминокислотных замен, замен аминокислот в областях, которые не способствуют или только частично способствуют специфичности связывания при образовании пары с тяжелой цепью, и т. п.

В настоящем документе термин «содержать» и его формы используется в его неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за этим словом, включены, но элементы, которые конкретно не упомянуты, не исключены. Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен на «состоять по существу из», что означает, что соединение или вспомогательное соединение, определенное в настоящем документе, может содержать дополнительный компонент (компоненты) помимо конкретно указанных, причем указанный дополнительный компонент (компоненты) не изменяет уникальные характеристики изобретения.

Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с изобретением определяется как содержащий по существу полный IgG, который, однако, не обязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание сомнений, полноразмерный IgG содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константные (C) и переменные (V) области, которые можно разделить на домены, обозначенные CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Антитело IgG связывается с антигеном посредством доменов переменной области, содержащихся в Fab-части, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы посредством константных доменов, преимущественно посредством Fc-части.

Полноразмерные антитела согласно изобретению охватывают молекулы IgG, в которых могут присутствовать вариации, обеспечивающие желаемые характеристики.

Полноразмерный IgG не должен иметь делеций существенных частей любой из областей. Однако молекулы IgG, в которых один или более аминокислотных остатков удалены без существенного изменения характеристик связывания полученной молекулы IgG, охватываются термином «полноразмерный IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно в областях, отличных от CDR, где удаленные аминокислоты не являются существенными для антигенсвязывающей специфичности IgG.

«Производное антитела» представляет собой белок, который, за исключением областей CDR, отличается от аминокислотной последовательности природного антитела не более

чем 20 аминокислотами. Производное антитела, как раскрыто в настоящем документе, представляет собой антитело, которое отличается от указанной аминокислотной последовательности не более чем 20 аминокислотами.

- 5 «Процент (%) идентичности» применительно к последовательностям нуклеиновых кислот или аминокислотным последовательностям в настоящем документе определяется как процентная доля остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей для целей оптимального сравнения. Процент идентичности последовательностей при сравнении последовательностей нуклеиновых кислот определяют с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Advance® 11.5.2 с настройками по умолчанию, в котором используется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., (1994) Nuc. Acid Res. 22(22): 4673-4680), матрица замен swgapdnamt, штраф за открытие гэпа 15 и штраф за продолжение гэпа 6,66. Аминокислотные последовательности выравнивают с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Advance® 11.5.2 с настройками по умолчанию, в котором используется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., (1994) Nuc. Acid Res. 22(22): 4673-4680), матрица замен blosum62mt2, штраф за открытие гэпа 10 и штраф за продолжение гэпа 0,1.

- Поскольку антитело обычно распознает эпитоп антигена, и такой эпитоп может также присутствовать в других соединениях, антитела согласно настоящему изобретению, которые «специфично распознают» антиген, например, EGFR или LGR5, могут также распознавать другие соединения, если такие другие соединения содержат эпитоп того же типа. Следовательно, термин «специфично распознает» применительно к взаимодействию антигена и антитела не исключает связывания антител с другими соединениями, которые содержат эпитоп того же типа.

- 30 Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, приближенных друг к другу вследствие третичной укладки белка (так называемые линейные и конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные из смежных линейно расположенных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как для эпитопов, образованных третичной укладкой, конформация обычно утрачивается при обработке денатурирующими растворителями.

Эпитоп обычно может включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются

- 5 взаимозаменяемо и относятся к млекопитающим, таким как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и т. п. (например, пациенту, такому как пациент-человек, страдающий раком).

Термины «лечить», «лечение» и «осуществление лечения» в настоящем документе

- 10 относятся к любому типу вмешательства или процесса, осуществляемого применительно к, или введению активного агента или комбинации активных агентов субъекту с целью обращения вспять, облегчения, уменьшения интенсивности, ингибирования или замедления, или предотвращения прогрессирования, развития, степени тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических
- 15 показателей, связанных с заболеванием.

В настоящем документе термин «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, обеспечивающему положительный эффект, например, уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома

- 20 заболевания или расстройства, например, рака. Положительный эффект может принимать форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, включая улучшение по сравнению с измерением или наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии со способом. Например, положительный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или обращения вспять прогрессирования рака у
- 25 субъекта на любой клинической стадии, что подтверждается уменьшением или устранением клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшать размер опухоли, уменьшать присутствие циркулирующих опухолевых клеток, уменьшать или предотвращать метастазирование опухоли, замедлять или останавливать рост опухоли и/или
- 30 предотвращать или задерживать повторное возникновение или рецидив опухоли.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество»

- относится к количеству агента или комбинации агентов, которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этим
- 35 результатом может быть снижение, уменьшение интенсивности, временное облегчение, ослабление, отсрочка и/или облегчение одного или более признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое желаемое изменение биологической системы. В

некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для отсрочки развития опухоли. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или отсрочки рецидива опухоли. Эффективное количество может
 5 быть введено за одно или более введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшить количество раковых клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) ингибировать, задержать, до некоторой степени замедлить и может остановить инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; (iv) ингибировать метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли;
 10 (vi) предотвратить или отсрочить возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. В одном примере «эффективное количество» представляет собой количество антитела к EGFR/LGR5, которое влияет на уменьшение рака (например, уменьшение количества раковых клеток); замедление прогрессирования рака или предотвращение
 15 возобновления роста или рецидива рака.

Согласно настоящему изобретению предложено антителу или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий
 20 внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака. Слова «рак» и «опухоль» используются в настоящем документе и обычно оба относятся к раку, если специально не указано иное.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGF) (EGFR, ErbB1 или HER1) является членом семейства четырех рецепторных тирозинкиназ (RTK), названных Her- или
 25 cErbB-1, -2, -3 и -4. Известны различные синонимы EGFR, наиболее часто употребляемым из которых является EGFR. EGFR имеет внеклеточный домен (ECD), состоящий из четырех субдоменов, два из которых участвуют в связывании лиганда, а два – в гомодимеризации и гетеродимеризации. EGFR объединяет внеклеточные сигналы от множества лигандов, вызывая разнообразные внутриклеточные ответы.
 30 Основной путь передачи сигналов, активируемый EGFR, состоит из митогенного сигнального каскада Ras-митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Активация этого пути инициируется рекрутированием Grb2 к фосфорилированному по тирозину EGFR. Это приводит к активации Ras через связанный с Grb2 Ras-гуанин-нуклеотид обменивающий фактор Son of Sevenless (SOS). Кроме того, путь передачи сигналов
 35 киназа PI3-Akt также активируется EGFR, хотя эта активация намного сильнее в случае коэкспрессии ErbB-3 (HER3). EGFR вовлечен в несколько эпителиальных злокачественных новообразований человека, в частности, рак молочной железы,

мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, толстой кишки, яичника, головы и шеи и головного мозга. Обнаружены активирующие мутации в гене, а также сверхэкспрессия рецептора и его лигандов, приводящая к возникновению аутокринных петель активации. Поэтому эта РТК широко используется в качестве мишени для

5 противораковой терапии. Были разработаны как низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на РТК, так и моноклональные антитела (mAb), нацеленные на внеклеточные лиганд-связывающие домены, и к настоящему времени они продемонстрировали несколько клинических успехов, хотя в основном для отобранной

10 группы пациентов. Учетный номер в базе данных для белка EGFR человека и кодирующего его гена представляет собой GenBank NM_005228.3. Этот учетный номер в первую очередь дается для обеспечения дополнительного метода идентификации белка EGFR в качестве мишени, фактическая последовательность белка EGFR, связанного антителом, может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как мутации, встречающиеся при некоторых раковых заболеваниях, или

15 тому подобного.

Если в настоящем документе упоминается EGFR, это упоминание относится к EGFR человека, если не указано иное. Антигенсвязывающий сайт варибельного домена, связывающего EGFR, связывает EGFR и множество его вариантов, таких как

20 варианты, 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 этого семейства участвуют в сигнальном пути WNT: к ним относятся LGR4; LGR5 и

25 LGR6.

LGR5 – это рецептор 5, сопряженный с G-белком, содержащий богатые лейцином повторы. Альтернативными названиями гена или белка являются рецептор 5, сопряженный с G-белком, содержащий богатые лейцином повторы; содержащий

30 богатые лейцином повторы рецептор 5, сопряженный с G-белком; сопряженный с G-белком рецептор HG38; сопряженный с G-белком рецептор 49; сопряженный с G-белком рецептор 67; GPR67; GPR49; сопряженный с G-белком орфанный рецептор HG38; сопряженный с G-белком рецептор 49; GPR49; HG38 и FEX. Белок или антитело согласно изобретению, связывающие LGR5, связывают LGR5 человека. LGR5-

35 связывающий белок или антитело согласно изобретению могут благодаря сходству последовательностей и третичной структуры между человеческими ортологами и ортологами других млекопитающих также связывать, но не обязательно связывают,

такой ортолог. Учетные номера в базе данных для белка LGR5 человека и кодирующего его гена представляют собой: (NC_000012.12; NT_029419.13; NC_018923.2; NP_001264155.1; NP_001264156.1; NP_003658.1). Учетные номера в первую очередь даются для обеспечения дополнительного метода идентификации LGR5 в качестве мишени, фактическая последовательность связанного белка LGR5 может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как мутации, встречающиеся при некоторых раковых заболеваниях, или тому подобного. Сайт связывания антигена LGR5 связывает LGR5 и различные его варианты, такие как варианты, экспрессируемые некоторыми LGR5-положительными опухолевыми клетками.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта, такой как колоректальный рак. Предпочтительно рак представляет собой рак желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода. Рак желудка представляет собой рак, который развивается из слизистой оболочки желудка и, в частности, из находящихся в ней glanduloцитов, продуцирующих слизь. Такой рак также называется аденокарциномой или, в данном случае, аденокарциномой желудка, поскольку он развивается из слизистой оболочки желудка. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой аденокарциному желудка или рак, развивающийся из слизистой оболочки желудка, и эти понятия используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Рак пищевода представляет собой рак, который развивается из пищевода. Двумя основными подтипами являются ESCC (плоскоклеточная карцинома пищевода) и EAC (аденокарцинома пищевода). Рак пищеводно-желудочного перехода (также известный как аденокарцинома пищеводно-желудочного перехода) развивается из пищеводно-желудочного перехода.

В некоторых вариантах осуществления рак экспрессирует LGR5 и/или экспрессирует EGFR. В настоящем документе рак экспрессирует LGR5, если рак содержит клетки, экспрессирующие LGR5. Клетка, экспрессирующая LGR5, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующей LGR5. В настоящем документе рак экспрессирует EGFR, если рак содержит клетки, экспрессирующие EGFR. Клетка, экспрессирующая EGFR, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующей LGR5. Экспрессию также часто можно детектировать, инкубируя клетку с антителом, которое связывается с LGR5 или EGFR. Однако некоторые клетки не экспрессируют белок на достаточно высоком уровне для такого теста с антителами. В таких случаях предпочтительным является детектирование мРНК или других форм последовательности нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака желудка, пищевода или

5 пищеводно-желудочного перехода у субъекта с Her2-статусом, выбранным из Her2-положительного, Her2-высокого, Her2 3+, Her2 2+, Her2 1+, Her2 0 или Her2-отрицательного статуса субъекта. Предпочтительно субъект имеет Her2-отрицательный статус. Согласно изобретению дополнительно предложены способы лечения рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта с Her2-

10 отрицательным статусом, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога.

Предпочтительно указанное применение включает введение субъекту фиксированной дозы 1500 мг антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. В некоторых вариантах осуществления введения терапевтического соединения субъекту с

15 Her2-отрицательным статусом могут осуществляться еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Предпочтительно терапевтическое соединение вводят один раз каждые 2 недели.

Способы определения экспрессии рецептора эпидермального фактора роста человека 2

20 типа (HER2) у субъекта хорошо известны в данной области техники. Например, уровень экспрессии Her2 может быть установлен методом иммуногистохимии (ИНС) или (флуоресцентной) гибридизации in situ (ISH), что позволяет идентифицировать Her2-статус, включая определение Her2-отрицательного статуса у субъекта. Как, ИНС так и ISH являются четко определенными и стандартными процедурами, на постоянной

25 основе используемыми для установления Her2-статуса у людей. См., например, на рекомендации ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology – Американское общество клинической онкологии/College of American Pathologists – Коллегия американских патологов) согласно Bartley et al., (HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma. Arch Pathol Lab Med. 2016;140:1345–1363).

30 Например, использование антитела к HER-2/neu (клон 4B5) позволяет проводить полуколичественное детектирование антигена HER-2 в срезах FFPE (фиксированных в формалине и залитых парафином)-образцов аденокарциномы желудка/пищеводно-желудочной области, рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода с использованием ИНС. Окрашивание и оценку проводят в соответствии с

35 согласованными рекомендациями для данного типа рака. Такой тест ИНС обычно дает оценку от 0 до 3+, которая выражает количество белка рецептора HER2 на поверхности клеток в образце раковой ткани. На основании оценки ИНС пациент может быть

классифицирован как Her2-отрицательный, например, если измеренная оценка составляет 0 или 1+. В случае использования теста ISH для установления экспрессии Her2, например, использования зонда HER2 (17q11.2-q12) и зонда центромеры 17 (Cen 17), диагноз может быть либо «положительным», либо «отрицательным», что иногда также обозначается как «ноль» по HER2. Способ лечения согласно настоящему изобретению применяется к субъекту, который предпочтительно является Her2-отрицательным, как установлено методом ИНС и/или ISH.

10 Под субъектом с Her2-отрицательным статусом в настоящем документе подразумевается субъект, имеющий рак, раковую клетку или опухоль, которые являются Her2-отрицательными. Her2-статус может быть определен методами ИНС и/или ISH, как описано выше.

15 Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления лечению антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом предшествует этап диагностики Her2-статуса субъекта. Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления для лечения выбирают субъектов, имеющих Her2-отрицательный статус. Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления лечению субъекта предшествует этап диагностики у субъекта Her2-отрицательного рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода. Такой рак, который лечат способом согласно настоящему изобретению, включает аденокарциному желудка и рак пищевода, имеющий гистологию плоскоклеточной карциномы.

25 Указанная диагностика Her2-отрицательного статуса предпочтительно включает ISH- или ИНС-тестирование Her2-статуса.

30 Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления изобретения лечению Her2-отрицательного субъекта предшествует этап скрининга субъекта как имеющего Her2-отрицательный рак желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода. Такой рак, в частности, представляет собой аденокарциному. Указанный скрининг предпочтительно включает ISH- или ИНС-тестирование Her2-статуса.

35 Раковые заболевания, такие как рак желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода, могут быть связаны с наличием мутаций. Такие мутации включают мутации в известных онкогенах, таких как PIK3CA, KRAS и BRAF. Онкогенные мутации обычно описываются как активирующие мутации или мутации, приводящие к новым функциям. Другой тип мутации при раке включает гены-супрессоры опухолей, такие

как TP53, MLH1, CDKN2A и PTEN. Мутации в генах-супрессорах опухолей, как правило, являются инактивирующими.

TP53 кодирует фактор транскрипции, который регулирует ряд активностей, включая
 5 ответ на стресс и пролиферацию клеток. Мутации в TP53 ассоциированы с различными видами рака и, по оценкам, встречаются более чем в 50% случаев рака у человека, включая рак желудка и пищевода. В частности, было показано, что мутация TP53 R248Q ассоциирована с раком, включая рак желудка и пищевода (Pitolli et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019 20:6241). Нонсенс-мутации в положениях R196 и R342 были
 10 идентифицированы при ряде опухолей, таких как опухоли молочной железы и пищевода; а также яичника, предстательной железы, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, толстой/прямой кишки, легкого, пищевода, кости; соответственно (Priestly et al. *Nature* 2019 575: 210-216). В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе,
 15 применимы для лечения рака, имеющего мутацию TP53, в частности, мутацию, которая приводит к снижению экспрессии или активности TP53.

MLH1 (гомолог 1 MutL) кодирует белок, участвующий в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов в ДНК, и является известным геном-супрессором опухолей.
 20 Мутации в MLH1 ассоциированы с различными раковыми заболеваниями, включая рак желудочно-кишечного тракта. Низкие уровни MLH1 также ассоциированы с больными раком пищевода, имеющими рака пищевода в семейном анамнезе (Chang et al. *Oncol Lett.* 2015 9:430-436), и MLH1 мутирован у 1,39% пациентов со злокачественными новообразованиями пищевода (The AACR Project GENIE
 25 Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery.* 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). В частности, было показано, что мутация MLH1 V384D ассоциирована с раковыми заболеваниями, например, колоректальным раком (Ohsawa et al. *Molecular Medicine Reports* 2009 2:887-891). В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в
 30 настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию MLH1, в частности, мутацию, которая приводит к снижению экспрессии или активности MLH1.

PIK3CA (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа, каталитическая субъединица альфа) кодирует каталитическую субъединицу PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа)
 35 массой 110 кДа. Мутации в PIK3CA ассоциированы с различными раковыми заболеваниями, включая рак желудочно-кишечного тракта. По данным Американской ассоциации по изучению рака, PIK3CA мутирован у 12,75% пациентов со

злокачественными солидными опухолями. В частности, мутация PIK3CA H1047R присутствует у 2,91% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями, а мутация PIK3CA E545K присутствует у 2,55% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями (см. The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.) В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию PIK3CA, в частности, онкогенную мутацию в PIK2CA.

10 CDKN2A (ингибитор циклин-зависимой киназы 2A) кодирует белок, который ингибирует CDK4 и ARF. По данным Американской ассоциации по изучению рака, CDKN2A мутирован у 22,21% пациентов с карциномой пищевода, 28,7% пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода и 6,08% пациентов с аденокарциномой

15 желудка. В частности, мутация CDKN2A W110Ter присутствует приблизительно у 0,11% больных раком. (The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для

20 лечения рака, имеющего мутацию CDKN2A, в частности, мутацию, которая приводит к снижению экспрессии или активности CDKN2A.

PTEN (гомолог фосфатазы и тензина) кодирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу. По данным Американской ассоциации по изучению рака, PTEN

25 мутирован у 6,28% больных раком, 3,41% пациентов с аденокарциномой желудка, 2,37% пациентов с карциномой пищевода и 2,22% пациентов с аденокарциномой пищевода. В частности, мутация PTEN R130Ter (где Ter относится к терминирующему/стоп-кодону) присутствует у 0,21% всех пациентов с колоректальной карциномой (The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering

30 precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию PTEN, в частности, мутацию, которая приводит к снижению экспрессии или активности PTEN.

35 BRAF кодирует серин/треониновую протеинкиназу B-Raf, которая участвует в передаче сигналов, регулирующих рост. По данным Американской ассоциации по изучению

рака, BRAF мутирован у 1,91% пациентов с карциномой желудка и у 1,93% пациентов с аденокарциномой желудка. В частности, мутация BRAF V600E присутствует у 2,72% больных раком (см. The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.).

5 В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию BRAF, в частности, онкогенную мутацию в BRAF. Однако в некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака желудка, который не
10 имеет мутации BRAF V600E.

KRAS (Kirsten RAt Sarcoma) кодирует белок, который является участником пути RAS/MAPK. По данным Американской ассоциации по изучению рака, KRAS мутирован у 14,7% пациентов со злокачественными солидными опухолями, причем KRAS G12C
15 присутствует у 2,28% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями (см. The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.). В некоторых вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию KRAS, в
20 частности, онкогенную мутацию в KRAS.

UGT1A1 (уридиндифосфатглюкуронилтрансфераза 1A1) и UGT1A8 (уридиндифосфатглюкуронилтрансфераза 1A8) кодируют ферменты пути глюкуронидации. Известно, что несколько полиморфизмов, снижающих активность
25 ферментов, влияют на метаболизм и действие иринотекана. Например, аллель UGT1A1*6 (полиморфизм G71R), имеющий аллельную частоту около 0,13% в популяциях китайцев, корейцев и японцев, и аллель UGT1A1*28 (полиморфизм динуклеотидных повторов в последовательности ТАТА промоторной области) являются факторами риска развития нейтропении, вызванной иринотеканом. В некоторых
30 вариантах осуществления терапевтические соединения, раскрытые в настоящем документе, применимы для лечения рака, имеющего мутацию UGT1A1 и/или UGT1A8, в частности, мутацию, которая приводит к снижению экспрессии или активности UGT1A1 и/или UGT1A8.

35 АТМ (мутантный при атаксии-телеангиэктазии) является членом семейства серин-треонинкиназ и координирует клеточные ответы на повреждение ДНК посредством активации различных путей репарации ДНК и сигнальных путей. Мутации

зародышевой линии ATM ассоциированы с атаксией-телеангиэктазией, а соматические мутации ATM часто наблюдаются при раке эндометрия, толстой кишки, поджелудочной железы, молочной железы и уротелиальном раке.

- 5 В предпочтительных вариантах осуществления изобретения предложены способы лечения рака, имеющего мутацию в гене, кодирующем TP53, MLH1, PIK3CA, CDKN2A, UGT1A, UGT1A8, BRAF, PTEN и KRAS. Предпочтительно рак имеет одну или более мутаций, выбранных из TP53 R196T; TP53 R342T; TP53 R248Q; MLH1 V384D; PIK3CA H1047R; PIK3CA E545K; CDKN2A W110T; UGT1A1 G71R; UGT1A8 G71R; и KRAS
- 10 G12C. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак дикого типа по KRAS. В качестве альтернативы согласно изобретению предложены способы лечения рака, имеющего мутацию в гене, кодирующем ATM, в частности, мутацию W57T. В частности, согласно изобретению предложены способы лечения рака пищевода, в частности, ESCC, имеющего мутацию в гене, кодирующем ATM, в
- 15 частности, мутацию W57T.

В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R342T, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем MLH1, где мутация предпочтительно представляет собой V384D.

20

В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R248Q, рак имеет мутацию в гене, кодирующем PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой H1047R, рак имеет мутацию в гене, кодирующем CDKN2A, где мутация предпочтительно

25 представляет собой W110T, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.

Предпочтительно рак представляет собой рак пищевода, предпочтительно плоскоклеточную карциному пищевода (ESCC).

30

В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в гене, кодирующем BRAF. Однако рак предпочтительно не имеет мутации V600E в гене, кодирующем BRAF, и предпочтительно не имеет мутации R130Ter в гене, кодирующем PTEN. В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в гене, кодирующем KRAS, где мутация

35 предпочтительно представляет собой G12C, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.

В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R. В некоторых вариантах осуществления рак имеет мутацию в PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой E545K. Предпочтительно рак представляет собой рак желудка.

Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, описанное в настоящем документе, содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (EGF), и переменный домен, связывающий LGR5. EGFR предпочтительно представляет собой EGFR человека. LGR5 предпочтительно представляет собой LGR5 человека. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, описанное в настоящем документе, содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (EGF) человека, и переменный домен, связывающий LGR5 человека.

Предпочтительно антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, описанное в настоящем документе, содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (EGF) и препятствующий связыванию EGF с рецептором, и переменный домен, связывающий LGR5, где взаимодействие антитела с LGR5 на экспрессирующей LGR5 клетке не блокирует связывание Rspodin (RSPO) с LGR5. Способы определения того, блокирует ли антитело связывание Rspodin с LGR5, описаны в публикации WO2017069528, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В тех случаях, когда в настоящем документе приведены учетные номера или альтернативные названия белков/генов, они в первую очередь даны для обеспечения дополнительного метода идентификации указанного белка в качестве мишени, фактическая последовательность белка-мишени, связанного антителом согласно изобретению, может варьироваться, например, из-за мутации и/или альтернативного сплайсинга в кодирующем гене, например, встречающихся при некоторых раковых заболеваниях, или тому подобного. Белок-мишень связывается антителом при условии, что эпитоп присутствует в белке и эпитоп доступен для антитела.

Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, описанное в настоящем документе, предпочтительно препятствует связыванию лиганда EGFR с EGFR. Термин «препятствует связыванию» в настоящем документе означает, что связывание антитела или его функциональной части, производного и/или аналога с EGFR конкурирует с лигандом за связывание с рецептором EGF. Антителу или его функциональной части, производного и/или аналога способно уменьшать связывание лиганда, вытеснять лиганд, когда он уже связан с рецептором EGF, или способно, например, за счет стерических затруднений, по меньшей мере частично предотвращать связывание лиганда с рецептором EGF.

Антитело к EGFR, раскрытое в настоящем документе, предпочтительно ингибирует, соответственно, индуцированную лигандом EGFR передачу сигналов, измеряемую как индуцированный лигандом рост клеток VxPC3 (ATCC CRL-1687) или клеток VxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058), или индуцированную лигандом гибель клеток A431 (ATCC CRL-1555). EGFR может связывать ряд лигандов и стимулировать рост указанных клеток VxPC3 или клеток VxPC3-luc2. В присутствии лиганда EGFR рост клеток VxPC3 или VxPC3-luc2 стимулируется. Индуцированный лигандом EGFR рост клеток VxPC3 может быть измерен путем сравнения роста клеток в отсутствие и в присутствии лиганда. Предпочтительным лигандом EGFR для измерения индуцированного лигандом EGFR роста клеток VxPC3 или VxPC3-luc2 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-NB и 236-EG (см. также публикацию WO2017/069628, которая включена в настоящий документ посредством ссылки).

Антитело к EGFR, раскрытое в настоящем документе, предпочтительно ингибирует индуцированный лигандом EGFR рост клеток VxPC3 (ATCC CRL-1687) или клеток VxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058). EGFR может связывать ряд лигандов и стимулировать рост указанных клеток VxPC3 или клеток VxPC3-luc2. В присутствии лиганда рост клеток VxPC3 или VxPC3-luc2 стимулируется. Индуцированный лигандом EGFR рост клеток VxPC3 может быть измерен путем сравнения роста клеток в отсутствие и в присутствии лиганда. Предпочтительным лигандом EGFR для измерения индуцированного лигандом EGFR роста клеток VxPC3 или VxPC3-luc2 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 WO2017/069628, которая включена в настоящий документ посредством ссылки).

- 5 Во избежание сомнений, упоминание в настоящем документе роста клетки относится к изменению количества клеток. Ингибирование роста относится к уменьшению количества клеток, которое было бы получено в противном случае. Увеличение роста относится к увеличению количества клеток, которое было бы получено в противном случае. Рост клетки обычно относится к пролиферации этой клетки.
- 10 То, ингибирует ли антитело, описанное в настоящем документе, передачу сигналов или рост в мультиспецифичном формате, предпочтительно определяют способом, описанным в настоящем документе выше, с применением моноспецифичного моновалентного или моноспецифичного двухвалентного варианта антитела. Такое
- 15 антитело предпочтительно имеет сайты связывания с рецептором, передачу сигналов которого необходимо определить. Моноспецифичное моновалентное антитело может иметь переменный домен с нерелевантной специфичностью связывания, такой как специфичность к столбнячному анатоксину. Предпочтительным антителом является двухвалентное моноспецифичное антитело, в котором антигенсвязывающие
- 20 переменные домены состоят из переменных доменов, связывающих члена семейства рецепторов EGF.

- В своей программе для антител Bionics® компания Merus разработала мультиспецифичные антитела, нацеленные на EGFR и LGR5 (рецептор, сопряженный
- 25 с G-белком, содержащий богатые лейцином повторы). Эффективность таких мультиспецифичных антител оценивали *in vitro* и *in vivo* с использованием полученных от пациентов органоидов CRC и мышиных PDX-моделей, соответственно (см., например, публикацию WO2017/069628; которая включена в настоящий документ посредством ссылки). Было показано, что мультиспецифичные антитела, нацеленные
- 30 на EGFR и LGR5, ингибируют рост опухоли. Было показано, что активность таких ингибирующих антител коррелирует с уровнями экспрессии РНК LGR5 клетками рака. Особенно предпочтительными являются мультиспецифичные антитела, нацеленные на EGFR и LGR5, описанные в публикации WO2017/069628.
- 35 Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, описанное в настоящем документе, содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5. Переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5,

предпочтительно связывает эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности, представленной на фиг. 1, в которой аминокислотные остатки D43, G44, M46, F67, R90 и F91 участвуют в связывании антитела с эпитопом.

5

Вариабельный домен LGR5 предпочтительно представляет собой вариабельный домен, в котором одна или более из следующих замен аминокислотных остатков в LGR5: D43A, G44A, M46A, F67A, R90A и F91A, снижают связывание вариабельного домена с LGR5.

10

Эпитоп на внеклеточной части LGR5 предпочтительно расположен в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности, представленной на фиг. 1. Предпочтительно он представляет собой эпитоп, в котором связывание вариабельного домена LGR5 с LGR5 снижено за счет одной или более из следующих замен аминокислотных остатков: D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A в LGR5.

15

Согласно изобретению также предложено антитело с вариабельным доменом, связывающим внеклеточную часть EGFR, и вариабельным доменом, связывающим внеклеточную часть LGR5, где вариабельный домен к LGR5 связывает эпитоп на LGR5, расположенный в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности, представленной на фиг. 1.

20

Эпитоп на LGR5 предпочтительно представляет собой конформационный эпитоп. Эпитоп предпочтительно расположен в пределах аминокислотных остатков 40-95 последовательности, представленной на фиг. 1. Связывание антитела с LGR5 предпочтительно снижается за счет одной или более из следующих замен аминокислотных остатков: D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A.

25

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что M46, F67, R90 и F91 в LGR5, представленные на фиг. 1, представляют собой контактные остатки для вариабельного домена, как указано выше в настоящем документе, т. е. антигенсвязывающего сайта вариабельного домена, который связывает эпитоп LGR5. То, что замена аминокислотных остатков D43A и G44A снижает связывание антитела, может быть обусловлено тем, что они также являются контактными остатками, однако также возможно, что эти аминокислотные замены вызывают (незначительную) модификацию конформации части LGR5, которая имеет один или более других контактных остатков (т. е. в положениях 46, 67, 90 или 91), и это изменение

35

конформации является таким, что связывание антитела снижается. Эпитоп характеризуется упомянутыми аминокислотными заменами. То, связывается ли антитело с тем же эпитопом, можно определить различными способами. В иллюстративном способе клетки CHO экспрессируют LGR5 на клеточной мембране или на мутанте с заменой аланина, предпочтительно мутанте, содержащем одну или более из замен M46A, F67A, R90A или F91A. Тестируемое антитело приводят в контакт с клетками CHO и сравнивают связывание антитела с клетками. Тестируемое антитело связывает эпитоп, если оно связывается с LGR5 и в меньшей степени с LGR5 с заменой M46A, F67A, R90A или F91A. Сравнение связывания с панелью мутантов, каждый из которых содержит замену одного остатка аланина, является предпочтительным. Такие методы исследования связывания хорошо известны в данной области техники. Часто панель включает мутантов с заменой одного остатка аланина, охватывающих практически все аминокислотные остатки. Для LGR5 панель должна охватывать только внеклеточную часть белка и, при использовании клеток, – безусловно, часть, которая гарантирует связь с клеточной мембраной. Экспрессия конкретного мутанта может быть нарушена, но это легко детектируется с использованием одного или более антител к LGR5, которые связываются с разными областями. Если экспрессия в случае этих контрольных антител также снижена, уровень или укладка белка на мембране для этого конкретного мутанта нарушены. Характеристики связывания тестируемого антитела с панелью легко позволяют установить, проявляют ли тестируемые антитела сниженное связывание с мутантами с заменой M46A, F67A, R90A или F91A, и, таким образом, является ли тестируемое антитело антителом согласно изобретению. Сниженное связывание с мутантами с заменой M46A, F67A, R90A или F91A также позволяет установить, что эпитоп расположен в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности, представленной на фиг. 1. В предпочтительном варианте осуществления панель включает мутант с заменой D43A, мутант с заменой G44A или оба из них. Антитело с последовательностью VH, соответствующей VH MF5816, проявляет сниженное связывание с мутантами с этими заменами.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что аминокислотные остатки I462; G465; K489; I491; N493; и C499, представленные на фиг. 2, участвуют в связывании эпитопа антителом, содержащим вариабельный домен, как указано выше в настоящем документе. Участие в связывании предпочтительно определяют, наблюдая сниженное связывание вариабельного домена с EGFR с одной или более заменами аминокислотных остатков, выбранными из I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; и C499A.

В одном аспекте переменный домен, связывающий эпитоп на внеклеточной части EGFR человека, представляет собой переменный домен, связывающий эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 420-480 последовательности, представленной на фиг. 2. Предпочтительно связывание переменного домена с EGFR
5 снижается за счет одной или более из следующих замен аминокислотных остатков: I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; и C499A в EGFR. Связывание антитела с EGFR человека 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,
10 представленной на фиг. 2, предпочтительно в пределах 430-480 последовательности, представленной на фиг. 2; предпочтительно в пределах 438-469 последовательности, представленной на фиг. 2.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что контактные остатки
15 эпитопа, т. е. те, которыми переменный домен контактирует с EGFR человека, вероятно, представляют собой I462; K489; I491; и N493. Аминокислотные остатки G465 и C499, вероятно, косвенно участвуют в связывании антитела с EGFR.

Переменный домен, связывающий EGFR человека, предпочтительно представляет
20 собой переменный домен с переменной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере последовательность CDR3 из VH MF3755, представленной на фиг. 3, или последовательность CDR3, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из VH MF3755, представленной на фиг. 3.

25

Переменный домен, связывающий EGFR человека, предпочтительно представляет собой переменный домен с переменной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VH MF3755, представленной на фиг. 3; или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VH
30 MF3755, представленной на фиг. 3, с не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотной заменой.

Переменный домен, связывающий EGFR человека, предпочтительно представляет собой переменный домен с переменной областью тяжелой цепи, содержащей
35 последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4

или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно VH-цепи MF3755.

5 В одном варианте осуществления изобретения предложено антитело, содержащее
вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и вариабельный
домен, связывающий внеклеточную часть LGR5,

10 где вариабельная область тяжелой цепи указанного вариабельного домена
содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из EGFR-специфичной
вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370;
10 MF3755; MF4280 или MF4289, представленных на фиг. 3, или где вариабельная
область тяжелой цепи указанного вариабельного домена содержит последовательность
CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более
чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности
15 CDR3 из VH, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или
MF4289, представленных на фиг. 3. Указанный вариабельный домен предпочтительно
содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере
последовательность CDR3 из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, представленных
на фиг. 3.

20 Указанный вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную
область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2
и CDR3 из EGFR-специфичной вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из
группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, представленных на фиг.
3, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере
25 последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя,
предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной
аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из EGFR-специфичной
вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370;
MF3755; MF4280 или MF4289, представленных на фиг. 3. Указанный вариабельный
30 домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по
меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF3370; MF3755; MF4280
или MF4289, представленных на фиг. 3. Предпочтительная вариабельная область
тяжелой цепи представляет собой MF3755. Другая предпочтительная вариабельная
область тяжелой цепи представляет собой MF4280.

35 Антитело, содержащее вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR,
и вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, где вариабельные
домены, связывающие EGFR, имеют последовательность CDR3, последовательность
CDR1, CDR2 и CDR3 и/или последовательность VH, указанные выше в настоящем

документе, предпочтительно имеет переменный домен, связывающий LGR5, который содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из LGR5-специфичной переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 из VH, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательность CDR3 из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3.

Переменный домен к LGR5 предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из LGR5-специфичной переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 из LGR5-специфичной переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, представленных на фиг. 3. Особенно 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 предпочтительной является 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 одну или более их CDR, обладают большей эффективностью при применении для ингибирования роста рака или клеток,

восприимчивых к лиганду EGFR. В контексте биспецифичных или мультиспецифичных антител плечо антитела, содержащее вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи MF3755 или одну или более его CDR, хорошо комбинируется с плечом, содержащим вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи MF5818 или одну или более его CDR.

5
10
15
20
25
30

VH-цепи вариабельных доменов, связывающих EGFR или LGR5, могут иметь одну или более аминокислотных замен относительно последовательности, представленной на фиг. 3. VH-цепь предпочтительно имеет аминокислотную последовательность VH к EGFR или LGR5, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно последовательности VH-цепи, представленной на фиг. 3.

15
20
25
30

Последовательности CDR могут иметь одну или более замен аминокислотных остатков относительно последовательности CDR, представленной на фигурах. Такую одну или более замен, например, делают в целях оптимизации, предпочтительно для улучшения силы связывания или стабильности антитела. Оптимизацию, например, осуществляют посредством процедур мутагенеза, после проведения которых предпочтительно тестируют стабильность и/или аффинность связывания полученных антител и предпочтительно выбирают улучшенную EGFR-специфичную последовательность CDR или LGR5-специфичную последовательность CDR. Специалист в данной области техники легко может создать варианты антител, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR, в соответствии с изобретением. Например, может быть использована консервативная аминокислотная замена. Примеры консервативной аминокислотной замены включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, другим гидрофобным остатком и замену одного полярного остатка другим полярным остатком, например, замену аргинина лизином, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой или глутамина аспарагином.

35

Предпочтительно 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 в VH или VL, указанные в настоящем документе, предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Аминокислотные инсерции, делеции и замены в VH или VL, указанные в настоящем документе, предпочтительно не содержатся в области CDR3. Упомянутые аминокислотные инсерции, делеции и замены предпочтительно также не

содержатся в областях CDR1 и CDR2. Упомянутые аминокислотные инсерции, делеции и замены также предпочтительно не содержатся в области FR4.

Упомянутые не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

5 предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены, причем инсерции, делеции, замены или их комбинация предпочтительно не содержатся в области CDR3 VH-цепи, предпочтительно не содержатся в области CDR1, CDR2 или CDR3 VH-цепи и предпочтительно не содержатся в области FR4.

10

Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

15

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на

фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

20

где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5790, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5790, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

25

предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно

30

содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

35

предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5803, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5803, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

5 предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно

10 содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

15 предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5814, представленную на фиг. 3; или

20 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF5814, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

25 Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или

30 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

35 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

5

Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

10 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

15 где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5817, представленную на фиг. 3; или

20 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF5817, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, предпочтительно

25 содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или

30 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH; и

где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит

- аминокислотную последовательность VH-цепи MF5818, представленную на фиг. 3; или

35 - аминокислотную последовательность VH-цепи MF5818, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и

предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, или их комбинацию относительно указанной VH.

- 5 Дополнительные варианты раскрытых аминокислотных последовательностей, которые сохраняют связывание EGFR или LGR5, могут быть получены, например, из библиотек фагового дисплея, которые содержат перестроенную VL-область IGKV1-39/IGKJ1 человека (De Kruif et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010 (106)741-50) и набор областей VH, вносящих аминокислотные замены в аминокислотную последовательность области VH к EGFR или LGR5, раскрытой в настоящем документе, как описано ранее (например, 10 WO2017/069628). Фаги, кодирующие области Fab, которые связывают EGFR или LGR5, могут быть отобраны и исследованы методом проточной цитометрии, а также секвенированы для идентификации вариантов с аминокислотными заменами, инсерциями, делециями или добавлениями, которые сохраняют связывание антигена.
- 15 Вариабельные области легкой цепи вариабельных доменов к EGFR и LGR5 VH/VL антитела к EGFR/LGR5 могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления область VL вариабельного домена к EGFR VH/VL антитела к EGFR/LGR5 аналогична области VL вариабельного домена к LGR5 VH/VL. В некоторых вариантах осуществления области VL в первом и втором вариабельных 20 доменах VH/VL являются идентичными.

- В отдельных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одного или обоих вариабельных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит общую вариабельную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления общая 25 вариабельная область легкой цепи одного или обоих вариабельных доменов VH/VL содержит V-сегмент вариабельной области IgV_k1-39 зародышевой линии. В отдельном варианте осуществления вариабельная область легкой цепи одного или обоих вариабельных доменов VH/VL содержит V-сегмент легкой капша-цепи IgV_k1-39*01. IgV_k1-39 – это сокращение от гена вариабельной капша-цепи иммуноглобулина 1-39. 30 Этот ген также известен как вариабельная капша-цепь иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39. Идентификаторы этого гена во внешних базах данных представляют собой: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Аминокислотная последовательность для подходящей V-области представлена на фиг. 4. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. Предпочтительные J- 35 области представляют собой jk1 и jk5, а соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия представляют собой: IgV_k1-39*01/IGJk1*01 или IgV_k1-39*01/IGJk5*01 (номенклатура согласно базе данных

IMGT в сети Интернет по адресу imgt.org). В отдельных вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит легкую цепь IgV_κ1-39*01/IGJ_κ1*01 или IgV_κ1-39*01/IGJ_κ1*05 (описанные на фиг. 4).

5

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к EGFR/LGR5 содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (описанную на фиг. 4), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS (описанную на фиг.

10

4), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (описанную на фиг. 4) (т. е. CDR из IGKV1-39 согласно IMGT). В некоторых вариантах

осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит LCDR1, содержащую

аминокислотную последовательность QSISSY (описанную на фиг. 4), LCDR2,

15

содержащую аминокислотную последовательность AASLQS (описанную на фиг. 4), и

LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (описанную на

фиг. 4).

В некоторых вариантах осуществления один или оба переменных домена VH/VL

20

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

25

фиг. 4. 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

30

меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной на фиг. 4.

Например, в некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного

или обоих переменных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 может иметь от 0 до

10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных инсерций, делеций, замен, добавлений,

35

или их комбинацию относительно последовательности, представленной на фиг. 4. В

некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или

обоих переменных 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, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных инсерций, делеций, замен, добавлений относительно указанной аминокислотной последовательности, или их комбинацию.

5

В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 4. В отдельных вариантах осуществления оба переменных домена VH/VL антитела к EGFR/LGR5 содержат идентичные области VL. В одном варианте осуществления VL обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к EGFR/LGR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 4. В одном варианте осуществления VL обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к EGFR/LGR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 4.

10

15

Антитело к EGFR/LGR5, описанное в настоящем документе, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два переменных домена, один из которых связывает EGFR, а другой связывает LGR5, как описано в настоящем документе. Биспецифические антитела к EGFR/LGR5 для применения в способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть выполнены в ряде форматов. В данной области техники известно множество различных форматов биспецифических антител, которые были рассмотрены Kontermann (*Drug Discov Today*, 2015 Jul;20(7):838-47; *MAbs*, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97) и в 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>), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Например, форматы биспецифических антител, которые не являются классическими антителами с двумя комбинациями VH/VL, имеют по меньшей мере переменный домен, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Этот переменный домен может быть связан с

20

25

30

одноцепочечным Fv-фрагментом, мономером, VH и Fab-фрагментом, который обеспечивает вторую связывающую активность.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела к EGFR/LGR5, применяемые в способах, предложенных в настоящем документе, обычно относятся к подклассу IgG человека (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В отдельных вариантах осуществления антитела относятся к подклассу IgG1 человека. Полноразмерные антитела IgG являются предпочтительными из-за их благоприятного периода

35

полужизни и по причинам низкой иммуногенности. Соответственно, в отдельных вариантах осуществления биспецифичное антитело к EGFR/LGR5 представляет собой полноразмерную молекулу IgG. В одном варианте осуществления биспецифичное антитело к EGFR/LGR5 представляет собой полноразмерную молекулу IgG1.

5

Соответственно, в отдельных вариантах осуществления биспецифичное антитело к EGFR/LGR5 содержит кристаллизующийся фрагмент (Fc). Fc биспецифичного антитела к EGFR/LGR5 предпочтительно состоит из константной области человека. Константная область или Fc биспецифичного антитела к EGFR/LGR5 может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных отличий от константной области встречающегося в природе человеческого антитела. Например, в отдельных вариантах осуществления каждое Fab-плечо биспецифичных антител может дополнительно включать Fc-область, содержащую модификации, способствующие образованию биспецифичного антитела, способствующие стабильности и/или другим признакам, описанным в настоящем документе.

10

15

20

25

Биспецифичные антитела обычно продуцируются клетками, экспрессирующими нуклеиновую кислоту (кислоты), кодирующую антитело. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления биспецифичные антитела к EGFR/LGR5, раскрытые в настоящем документе, получают путем обеспечения клетки, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих переменные области тяжелой и легкой цепей и константные области биспецифичного антитела к EGFR/LGR5. Клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно клетку человека. Подходящая клетка представляет собой любую клетку, способную содержать и предпочтительно продуцировать биспецифичное антитело к EGFR/LGR5.

30

35

Клетки, подходящие для продукции антител, известны в данной области техники и включают клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6. Различные учреждения и компании разработали линии клеток для крупномасштабного производства антител, например, для клинического применения. Неограничивающими примерами таких линий клеток являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.C6. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку человека. Предпочтительно клетку трансформируют областью E1 аденовируса или ее функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой линии клеток

является линия клеток PER.C6 или ее эквивалент. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительно в варианте используется векторная система глутаминсинтетазы (GS) для экспрессии антитела. В одном предпочтительном варианте клетка представляет собой клетку CHO.

В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует разные легкие и тяжелые цепи, составляющие биспецифичное антитело к EGFR/LGR5. В отдельных вариантах осуществления клетка экспрессирует две разные 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 вариантов антител (комбинаций различных тяжелых и легких цепей). Например, соответствующие области VH клонируют в векторы экспрессии методами, известными в данной области техники, для получения биспецифичного IgG (WO2013/157954; включена в настоящий документ посредством ссылки) в сочетании с перестроенной легкой цепью IGKV1 39/IGKJ1 человека (huVκ1 39), для которой ранее была показана способность образовывать пары более чем с одной тяжелой цепью, тем самым обеспечивая антитела с разными специфичностями, что облегчает образование биспецифичных молекул (De Kruif et al. J. Mol. Biol. 2009 (387) 548 58; WO2009/157771).

Клетка, продуцирующая антитело, которая экспрессирует общую легкую цепь и равные количества двух тяжелых цепей, обычно продуцирует 50% биспецифичного антитела и 25% каждого из моноспецифичных антител (т. е. имеющих идентичные комбинации тяжелых и легких цепей). Опубликовано несколько методов стимулирования продукции биспецифичного антитела по сравнению с продукцией соответствующих моноспецифичных антител. Обычно это достигается путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, чтобы они благоприятствовали гетеродимеризации (т. е. димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелой/легкой цепи) по сравнению с гомодимеризацией. В предпочтительном варианте биспецифичное антитело согласно изобретению содержит две разные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. В данной области техники описаны различные совместимые домены гетеродимеризации. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации тяжелой цепи иммуноглобулина CH3. В данной области техники описаны различные способы, которыми может быть достигнута такая гетеродимеризация тяжелых цепей.

Один предпочтительный способ получения биспецифичного антитела к EGFR/LGR5 раскрыт в патентах US 9248181 и US 9358286. В частности, предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифичных полноразмерных молекул IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация EU) в первом домене СН3 («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены L351D и L368E в втором домене («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот. Как описано ранее, DE-вариант и КК-вариант предпочтительно образуют пары с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифичных молекул «ДЕКК»). Гомодимеризация DE-вариантов тяжелых цепей (DEDE-гомодимеры) или КК-вариантов тяжелых цепей (КККК-гомодимеры) практически не происходит из-за сильного отталкивания между заряженными остатками на границе контакта СН3-СН3 между идентичными тяжелыми цепями.

Соответственно, в одном варианте осуществления комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, содержащая переменный домен, связывающий EGFR, содержит DE-вариант тяжелой цепи. В этом варианте осуществления комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, содержащая переменный домен, связывающий LGR5, содержит КК-вариант тяжелой цепи.

Биспецифичное антитело-кандидат IgG к EGFR/LGR5 может быть протестировано на связывание с использованием любого подходящего анализа. Например, связывание с мембранно-экспрессируемым EGFR или LGR5 на клетках CHO может быть оценено методом проточной цитометрии (в соответствии с процедурой FACS, описанной ранее в WO2017/069628). В одном варианте осуществления связывание биспецифичного антитела-кандидата к EGFR/LGR5 с LGR5 на клетках CHO демонстрируют методом проточной цитометрии, проводимой в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Связывание с клетками CHO сравнивают с клетками CHO, которые не были трансфицированы кассетами экспрессии для EGFR и/или LGR5. Связывание биспецифичного IgG1-кандидата с EGFR определяют с использованием клеток CHO, трансфицированных конструкцией экспрессии EGFR; моноспецифичное антитело к LGR5 и моноспецифичное антитело к EGFR, а также нерелевантное контрольное mAb изотипа IgG1 включают в анализ в качестве контролей (например, антитело, которое связывает LGR5 и другой антиген, такой как столбнячный токсин (ТТ)).

Аффинности Fab к LGR5 и EGFR биспецифичного антитела-кандидата к EGFR/LGR5 к их мишеням могут быть измерены по технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием BIAcore T100. Вкратце, мышиное моноклональное антитело против человеческого IgG (Becton and Dickinson, кат. № 555784) связывают с 5 поверхностями сенсорного чипа CM5 с использованием реакции свободных аминов (NHS/EDC). Затем bsAb захватывается на поверхности сенсора. После этого рекомбинантные очищенные антигены EGFR человека (Sino Biological Inc, кат. № 11896-H07H) и белок LGR5 человека пропускают по поверхности сенсора в диапазоне 10 концентраций для измерения скоростей ассоциации и диссоциации. После каждого цикла поверхность сенсора регенерируют промывкой HCl, и bsAb снова захватывается. Из полученных сенсограмм определяют скорости ассоциации и диссоциации и значения аффинности для связывания с LGR5 и EGFR человека с использованием программного обеспечения BIAevaluation, как описано ранее для CD3 в заявке US 2016/0368988.

15 Антитело, раскрытое в настоящем документе, обычно представляет собой биспецифичное полноразмерное антитело, предпочтительно подкласса IgG человека, предпочтительно подкласса IgG1 человека. Такие антитела обладают хорошими свойствами АЗКЦ, которые при желании могут быть усилены методами, известными в 20 данной области техники, имеют благоприятное время полужизни при введении человеку *in vivo*, и существует технология конструирования СНЗ, которая может обеспечить модифицированные тяжелые цепи, которые преимущественно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры, при коэкспрессии в клональных клетках.

25 АЗКЦ-активность антитела может быть улучшена, если антитело само по себе имеет низкую АЗКЦ-активность, путем модификации константной области антитела. Другой способ улучшения АЗКЦ-активности антитела заключается в ферментативном вмешательстве в путь гликозилирования, что приводит к снижению уровня фукозы. Существует несколько методов *in vitro* для определения эффективности антител или 30 эффекторных клеток в отношении индукции АЗКЦ. К ним относятся анализы высвобождения хрома-51 [Cr51], анализы высвобождения европия [Eu] и анализы высвобождения серы-35 [S35]. Обычно меченую линию клеток, экспрессирующую определенный антиген, экспонируемый на поверхности, инкубируют с антителом, специфичным к этому антигену. После промывки эффекторные клетки, 35 экспрессирующие Fc-рецептор CD16, инкубируют совместно с мечеными антителами клетками-мишенями. Затем лизис клеток-мишеней измеряют по высвобождению

внутриклеточной метки с использованием сцинтилляционного счётчика или спектрофотометрии.

5 Биспецифичное антитело, раскрытое в настоящем документе, может обладать повышенной активностью индукции АЗКЦ. Биспецифичное антитело в одном варианте осуществления может быть афукозилированным. Биспецифичное антитело предпочтительно имеет сниженную степень фукозилирования N-связанной углеводной структуры в Fc-области по сравнению с таким же антителом, продуцируемым в нормальной клетке СНО.

10 Антитело, содержащее вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, может дополнительно содержать один или более дополнительных вариабельных доменов, которые могут связывать одну или более дополнительных мишеней. Дополнительная мишень
15 предпочтительно представляет собой белок, предпочтительно мембранный белок, содержащий внеклеточную часть. Мембранный белок в настоящем документе представляет собой белок клеточной мембраны, такой как белок, который находится во внешней мембране клетки – мембране, отделяющей клетку от внешнего мира. Мембранный белок имеет внеклеточную часть. Мембранный белок находится на
20 клетке, по меньшей мере если он содержит трансмембранную область, которая находится в клеточной мембране клетки.

В данной области техники известны антитела с более чем двумя вариабельными доменами. Например, к константной части антитела можно присоединить
25 дополнительный вариабельный домен. Антитело с тремя или более вариабельными доменами предпочтительно представляет собой мультивалентное мультимерное антитело, как описано в заявке PCT/NL2019/050199, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

30 В одном варианте осуществления антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее два вариабельных домена, где один вариабельный домен связывает внеклеточную часть EGFR, а другой вариабельный домен связывает внеклеточную часть LGR5. Вариабельные домены предпочтительно представляют собой вариабельные домены, описанные в настоящем документе.

35 Функциональная часть антитела, описанного в настоящем документе, содержит по меньшей мере вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и

вариабельный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, описанные в настоящем документе. Таким образом, она содержит антигенсвязывающие части антитела, описанного в настоящем документе, и обычно содержит вариабельные домены указанного антитела. Вариабельный домен функциональной части может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент или так называемый фрагмент однодоменного антитела. Фрагмент однодоменного антитела (sdAb) представляет собой фрагмент антитела с одним мономерным вариабельным доменом антитела. Подобно целому антителу, он способен селективно связываться с определенным антигеном. Имея молекулярную массу всего 12–15 кДа, фрагменты однодоменных антител намного меньше, чем обычные антитела (150–160 кДа), состоящие из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab-фрагменты (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные вариабельные фрагменты (~25 кДа, два вариабельных домена, один из легкой и один из тяжелой цепи). Однодоменные антитела сами по себе ненамного меньше обычных антител (обычно 90-100 кДа). Фрагменты однодоменных антител в основном получают методами генной инженерии из антител из тяжелых цепей, присутствующих у верблюдовых; они называются фрагментами VHH (Nanobodies®). У некоторых рыб также есть антитела только с тяжелой цепью (IgNAR, «иммуноглобулин с новым антигенным рецептором»), из которых можно получить фрагменты однодоменных антител, называемые фрагментами VNAR. Альтернативный подход заключается в разделении димерных вариабельных доменов из обычного иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на вариабельных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфично связываются с эпитопами-мишенями. Неограничивающими примерами таких вариабельных доменов частей антител являются VHH, человеческие доменные антитела (dAb) и унитела (Unibodies). Предпочтительные части или производные антител содержат по меньшей мере два вариабельных домена антитела или их эквивалента. Неограничивающими примерами таких вариабельных доменов или их эквивалентов являются F(ab)-фрагменты и одноцепочечные Fv-фрагменты. Функциональная часть биспецифичного антитела содержит антигенсвязывающие части биспецифичного антитела, или производное и/или аналог связывающих частей. Как упоминалось выше в настоящем документе, связывающая часть антитела содержится в вариабельном домене.

Также предложено антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, раскрытые в настоящем документе (т. е. терапевтическое соединение), и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции

определенного периода времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. В одном варианте осуществления субъекту вводят разовую дозу антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение будет введено многократно в течение курса лечения. Например, в отдельных вариантах осуществления субъекту, нуждающемуся в лечении, вводят несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) доз терапевтического соединения. В некоторых вариантах осуществления введения терапевтического соединения могут осуществляться еженедельно, раз в две недели или ежемесячно.

Клиницист может использовать предпочтительные дозировки в зависимости от состояния пациента, лечение которого осуществляют. Доза может зависеть от ряда факторов, включая стадию заболевания и т. д. Определение конкретной дозы, которую следует вводить, на основании наличия одного или нескольких таких факторов находится в рамках компетенции специалиста в данной области техники. Обычно лечение начинают с более низких дозировок, составляющих меньше оптимальной дозы соединения. После этого дозировку увеличивают небольшими количествами до тех пор, пока не будет достигнут оптимальный в данных обстоятельствах эффект. Для удобства общая суточная дозировка может быть разделена и при желании может вводиться порциями в течение дня. Также может быть использована прерывистая терапия (например, одна неделя из трех или три недели из четырех).

В отдельных вариантах осуществления терапевтическое соединение 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 терапевтическое соединение вводят в дозе 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела.

В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое соединение (т. е. антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5) предоставляют субъекту в дозировке 1500 мг. Фиксированная дозировка имеет несколько преимуществ по сравнению с дозировкой, требующей пересчета на поверхность тела или на вес, поскольку она сокращает время подготовки и уменьшает вероятность ошибок при расчете дозы. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение предоставляют в дозировке по меньшей мере 1100 мг, предпочтительно в дозировке от 1100 до 2000 мг,

более предпочтительно в дозировке от 1100 до 1800 мг. Как понятно специалисту в данной области техники, дозировка может быть введена в течение определенного периода времени. Например, дозировка может быть введена внутривенно, например, в виде инфузии в течение 1-6 часов, предпочтительно инфузии в течение 2-4 часов. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение вводят один раз каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе фиксированные дозировки подходят для применения у взрослых и/или у субъектов с массой тела не менее 35 кг. Предпочтительно субъект страдает раком желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода.

10

В некоторых вариантах осуществления может быть использована схема премедикации. Такая схема может быть полезна для снижения вероятности или тяжести инфузионных реакций. Как правило, стероид, такой как дексаметазон, и/или антигистаминный препарат, такой как дексхлорфенирамин, дифенгидрамин или хлорфенирамин, вводят (например, перорально, внутривенно) перед лечением антителиом.

15

Проведение описанного в настоящем документе способа лечения обычно продолжают до тех пор, пока клиницист, контролирующий помощь, оказываемую пациенту, считает этот способ лечения эффективным, т. е. пока пациент отвечает на лечение.

20

Неограничивающие параметры, указывающие на эффективность способа лечения, могут включать один или более из следующих: уменьшение количества опухолевых клеток; ингибирование пролиферации опухолевых клеток; элиминация опухолевых клеток; выживаемость без прогрессирования; надлежащий ответ подходящего онкомаркера (если применимо).

25

Что касается частоты введения терапевтического соединения, подходящую частоту сможет определить специалист в данной области техники. Например, клиницист может решить вводить терапевтическое соединение относительно редко (например, один раз в две недели) и постепенно сокращать период между дозами в зависимости от

30

переносимости пациентом. Примерные периоды времени, связанные с курсом терапии в соответствии с заявляемым способом, включают: около одной недели; две недели; около трех недель; около четырех недель; около пяти недель; около шести недель; около семи недель; около восьми недель; около девяти недель; около десяти недель; около одиннадцати недель; около двенадцати недель; около тринадцати недель; около

35

четырнадцати недель; около пятнадцати недель; около шестнадцати недель; около семнадцати недель; около восемнадцати недель; около девятнадцати недель; около двадцати недель; около двадцати одной недели; около двадцати двух недель; около

двадцати трех недель; около двадцати четырех недель; около семи месяцев; около восьми месяцев; около девяти месяцев; около десяти месяцев; около одиннадцати месяцев; около двенадцати месяцев; около тринадцати месяцев; около четырнадцати месяцев; около пятнадцати месяцев; около шестнадцати месяцев; около семнадцати месяцев; около восемнадцати месяцев; около девятнадцати месяцев; около двадцати месяцев; около двадцати одного месяца; около двадцати двух месяцев; около двадцати трех месяцев; около двадцати четырех месяцев; около тридцати месяцев; около трех лет; около четырех лет; около пяти лет; неограниченный период (например, постоянная поддерживающая терапия). Вышеупомянутая продолжительность может быть связана с одним или несколькими раундами/циклами лечения.

Эффективность способов лечения, предложенных в настоящем документе, может быть оценена с использованием любых подходящих средств. В одном варианте осуществления клиническую эффективность лечения анализируют, используя снижение количества раковых клеток в качестве критерия объективного ответа. Пациенты, например люди, получающие лечение способами, раскрытыми в настоящем документе, предпочтительно испытывают улучшение по меньшей мере одного признака рака. В некоторых вариантах осуществления может иметь место одно или более из следующего: количество раковых клеток может быть уменьшено; рецидив рака предотвращен или задержан; один или более симптомов, связанных с раком, могут быть облегчены до некоторой степени. Кроме того, проводят анализы *in vitro* для определения опосредованного Т-клетками лизиса клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления оценка опухоли основана на КТ-сканировании и/или МРТ-сканировании, см., например, руководство RECIST 1.1 (Критерии оценки ответа солидных опухолей) (Eisenhauer et al., 2009 Eur J Cancer 45:228–247). Такие оценки обычно проводят каждые 4-8 недель после лечения.

В некоторых вариантах осуществления опухолевые клетки больше не обнаруживаются после лечения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект находится в частичной или полной ремиссии. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет повышенную общую выживаемость, медианную выживаемость и/или выживаемость без прогрессирования.

Терапевтическое соединение (т. е. антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5) также может применяться в сочетании с другими хорошо известными методами

лечения (например, химиотерапией или лучевой терапией), выбранными на основании их особой эффективности против рака, лечение которого осуществляют.

5 Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в Настольном справочнике врача (Physicians' Desk Reference, PDR), например, издании 1996 г. (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки на него.

10 Специалистам в данной области техники будет очевидно, что введение химиотерапевтического агента (агентов) и/или проведение лучевой терапии можно варьировать в зависимости от заболевания, лечение которого осуществляют, и известных действий химиотерапевтического агента (агентов) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного

15 клинициста, протоколы лечения (например, величины дозировок и время введения) могут варьироваться с учетом наблюдаемых эффектов вводимых терапевтических агентов на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические агенты.

20 Соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, применимы в качестве терапии и в терапевтическом лечении и, таким образом, могут быть применимы в качестве лекарственных средств и применяться в способе получения лекарственного средства.

25 Все документы и ссылки, включая записи Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, а также веб-сайты, описанные в настоящем документе, прямо включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы они были полностью или частично изложены в этом документе.

30 В целях ясности и краткости описания признаки описаны в настоящем документе как часть одного и того же или отдельных вариантов осуществления, однако следует иметь в виду, что объем изобретения может включать варианты осуществления, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

35 Далее изобретение описано со ссылкой на следующие ниже примеры, которые являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего

изобретения. Хотя изобретение было описано подробно и со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалисту в данной области техники будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации без отклонения от его сущности и объема.

5

ПРИМЕРЫ

В настоящем документе «MFXXXX», где X независимо представляет собой число от 0 до 9, относится к Fab, содержащему вариабельный домен, где VH имеет аминокислотную последовательность, идентифицированную 4 цифрами, представленными на фиг. 3.

- 10 Если не указано иное, вариабельная область легкой цепи вариабельного домена обычно имеет последовательность, представленную на фиг. 4b. Легкая цепь в примерах имеет последовательность, представленную на фиг. 4a. «MFXXXX VH» относится к аминокислотной последовательности VH, идентифицированной 4 цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную область
- 15 тяжелой цепи, которая, как правило, взаимодействует с константной областью легкой цепи. VH/вариабельная область тяжелых цепей является различной, и, как правило, также область CH3, где одна из тяжелых цепей имеет мутацию KK в ее домене CH3, а другая имеет комплементарную мутацию DE в ее домене CH3 (см. для справки заявку PCT/NL2013/050294 (опубликованную под номером WO2013/157954) и фиг. 5d и 5e.
- 20 Биспецифичные антитела в примерах имеют Fc-хвост с доменом гетеродимеризации KK/DE CH3, домен CH2 и домен CH1, представленные на фиг. 5, общую легкую цепь, представленную на фиг. 4a, и VH, обозначенную номером MF. Например, биспецифичное антитело, обозначенное как MF3755 xMF5816, имеет вышеуказанные основные последовательности и вариабельный домен с VH с последовательностью
- 25 MF3755 и вариабельный домен с VH с последовательностью MF5816.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот различных вариабельных областей тяжелой цепи (VH) представлены на фиг. 3. Биспецифичные антитела к EGFR/LGR5 MF3755xMF5816, содержащие вариабельные области тяжелой цепи

30 MF3755 и MF5816 и общую легкую цепь и включающие модификации для повышения активности индукции АЗКЦ в результате афукозилирования, среди других комбинаций LGR5 и EGFR, представленных на фиг. 3, являются эффективными, как показано в WO 2017/069628.

35 Получение биспецифичных антител

Биспецифичные антитела получали путем временной котрансфекции двух плазмид, кодирующих IgG с разными доменами VH, с использованием запатентованной

технологии конструирования СНЗ для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифичных антител. Общую легкую цепь также котрансфицировали в ту же клетку либо на той же плазмиде, либо на другой плазмиде. В заявках авторов настоящего изобретения (например, WO2013/157954 и WO2013/157953; включены в
5 настоящей документ посредством ссылки) авторы раскрыли методы и средства для получения биспецифичных антител из одной клетки, при этом предложены средства, которые благоприятствуют образованию биспецифичных антител по сравнению с образованием моноспецифичных антител. Эти способы также могут быть предпочтительно использованы в настоящем изобретении. В частности,
10 предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифичных полноразмерных молекул IgG являются аминокислотные замены в положениях 351 и 366, например, L351K и T366K (нумерация согласно нумерации EU) в первом домене СНЗ («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены в положениях 351 и 368, например, L351D и L368E во втором домене СНЗ («DE-вариант» тяжелой цепи), или
15 наоборот (см. фиг. 5d и 5e). Ранее в упомянутых заявках было продемонстрировано, что отрицательно заряженная тяжелая цепь DE-варианта и положительно заряженная тяжелая цепь КК-варианта преимущественно образуют пары с образованием гетеродимеров (так называемые биспецифичные молекулы «ДЕКК»). Гомодимеризации DE-вариантов тяжелых цепей (DE-DE-гомодимеры) или КК-вариантов тяжелых цепей (КК-КК-гомодимеры) практически не происходит из-за сильного отталкивания между
20 заряженными остатками на границе контакта СНЗ-СНЗ между идентичными тяжелыми цепями.

Гены VH переменного домена, связывающие описанный выше LGR5, клонировали в
25 вектор, кодирующий положительно заряженный домен СНЗ. Гены VH переменного домена, связывающие EGFR, такие как гены, раскрытые в публикации WO 2015/130172 (включена в настоящий документ посредством ссылки), клонировали в вектор, кодирующий отрицательно заряженный домен СНЗ. Адаптированные к росту в
30 суспензии клетки 293F Freestyle культивировали в колбах T125 на платформе для встряхивания до 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. Клетки временно трансфицировали смесью двух плазмид, кодирующих разные антитела, клонированных в запатентованную векторную систему. Через семь дней после трансфекции клеточный супернатант собирали и фильтровали через фильтр на $0,22$
35 мкМ (Sartorius). Стерильный супернатант хранили при 4°C до очистки антител.

Очистка и количественный анализ IgG

Очистку проводили в стерильных условиях на фильтровальных планшетах с использованием аффинной хроматографии с белком А. Сначала рН среды доводили до рН 8,0, а затем супернатанты, содержащие IgG, инкубировали с гранулами с белком А, иммобилизованным на сефарозу CL-4B (50% об./об.) (Pierce), в течение 2 часов при 25 °С на платформе для встряхивания при 600 об/мин. Затем гранулы собирали фильтрацией. Гранулы дважды промывали PBS с рН 7,4. Затем связанный IgG элюировали при рН 3,0 с использованием 0,1 М цитратного буфера и элюат немедленно нейтрализовали, используя Трис, рН 8,0. Замену буфера проводили центрифугированием с использованием мультипланшетов Multiscreen Ultracel 10 (Millipore). Наконец, образцы собирали в PBS с рН 7,4. Концентрацию IgG измеряли с использованием Octet. Образцы белка хранили при 4 °С.

Для определения количества очищенного IgG концентрацию антител определяли с использованием анализа посредством системы Octet с использованием биосенсоров с белком А (Forte-Bio, согласно рекомендациям поставщика) с использованием полностью человеческого IgG (Sigma Aldrich, кат. № I4506) в качестве стандарта.

Следующие биспецифичные антитела являются подходящими для применения в этом примере и для применения в способах согласно изобретению: MF3370xMF5790, MF3370x5803, MF3370x5805, MF3370x5808, MF3370x5809, MF3370x5814, MF3370x5816, MF3370x5817, MF3370x5818, MF3755xMF5790, MF3755x5803, MF3755x5805, MF3755x5808, MF3755x5809, MF3755x5814, MF3755x5816, MF3755x5817, MF3755x5818, MF4280xMF5790, MF4280x5803, MF4280x5805, MF4280x5808, MF4280x5809, MF4280x5814, MF4280x5816, MF4280x5817, MF4280x5818, MF4289xMF5790, MF4289x5803, MF4289x5805, MF4289x5808, MF4289x5809, MF4289x5814, MF4289x5816, MF4289x5817 и MF4289x5818. Каждое биспецифичное антитело содержит два VH, обозначенные номерами MF, способные связывать EGFR и LGR5, соответственно, дополнительно содержит Fc-хвост с доменом гетеродимеризации KK/DE CH3, соответствующим SEQ ID NO: 136 (фиг. 5d) и SEQ ID NO: 138 (фиг. 5e), соответственно, домен CH2, соответствующий SEQ ID NO: 134 (фиг. 5c), и домен CH1, соответствующий SEQ ID NO: 131 (фиг. 5a), общую легкую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 121 (фиг. 4).

Пример 1: Оценка кандидата анти-EGFR и анти-LGR5 против различных видов рака:

Выбор мышинной модели

Компания Crown Biosciences Inc. разработала коллекцию моделей ксенотрансплантатов, полученных от пациентов (PDX), полученных из хирургически удаленных первичных опухолей человека (база данных Crown Bioscience, <http://hubase.crownbio.com>). PDX-модели клинически и молекулярно аннотированы и точно отражают клиническую эпидемиологию соответствующих опухолей. Эти модели можно вводить подкожно в бока иммунодефицитных мышей. Различные модели рака тестировали на экспрессию EGFR и LGR5, используя анализ методом секвенирования РНК (RNAseq) (см. **ТАБЛИЦУ 1**). Для проверки эффективности биспецифичного антитела MF3755 x MF5816 был выбран ряд PDX-моделей рака пищевода и желудка, в которых были выявлены высокие уровни экспрессии EGFR и LGR5. Для рака пищевода были выбраны 4 PDX-модели, а для рака желудка – 8 PDX-моделей. Подробная информация о PDX-моделях, включая подтип рака, известные драйверные мутации, экспрессию EGFR/LGR5 и время до рандомизации, приведена в (**ТАБЛИЦЕ 1**).

ТАБЛИЦА 1

Характеристики PDX-моделей, полученных от пациентов с раком пищевода и желудка.

Экспрессию LGR5 и EGFR определяли с использованием секвенирования РНК (RNAseq). Статус мутаций онкогенных факторов определяли с использованием геномного анализа. Также указано время до рандомизации (когда средний размер опухоли достигает 5 приблизительно 100-150 мм³), а также характеристики роста опухолей. ESCC = плоскоклеточная карцинома пищевода; EAC = аденокарцинома пищевода; ADC = аденокарцинома; N/A = Недоступно или неприменимо.

Модель	Подтип	Известные мутации	Экспрессия EGFR	Экспрессия LGR5	Время до рандомизации	Характеристики роста
Тип рака: Рак пищевода						
ES0042	ESCC	TP53 - R196T	6,3346	3,6394	~14-24 дней	Изъязвление
ES0199	ESCC	TP53 - R342T; MLH1 - V384D	7,0919	2,5491	~18-40 дней	
ES0201	ESCC	PIK3CA - E545K	5,7606	1,8863	~18-46 дней	
ES2356	ESCC	TP53 - R248Q; PIK3CA- H1047R; CDKN2A-W110T; UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	7,0124	3,2865	~62 дня	
ES11065	ESCC	ATM – W57T	4,5	4,2		

Тип рака: Рак желудка						
GA0429	ADC		4,3486	4,4366	~22 дня	Кахексия
GA2434	ADC	BRAF - V600E; PTEN - R130Ter	3,4811	5,1645	~30 дней	
GA6212	ADC	KRAS - G12C; UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	4,9772	3,3944	~29 дней	Изъязвление
GA6822	ADC	UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	3,9165	3,9266	~22 дня	
GA6833	ADC	PIK3CA - E545K; UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	4,1009	5,4768	~25-45 дней	
GA6864	N/A		9,2291	3,5282	~25-45 дней	Изъязвление
GA6891	ADC	UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	3,8613	6,1634	~30 дней	
GA3236	ADC	UGT1A1 - G71R; UGT1A8- G71R	4,047	6,027	~10 -14 дней	

Методы

Свежую опухолевую ткань для инокуляции собирали у мышей с прижившимися первичными опухолями человека. Фрагменты опухоли (диаметром 2-3 мм) подкожно инокулировали в верхний правый бок со стороны спины 6-8-недельных самок мышей BALB/c Nude или NOD/SCID в зависимости от модели. При достижении опухолями размеров 100-150 мм³ мышей рандомизировали. Всего было включено 6 мышей на модель, 3 контрольные мыши и 3 мыши, получавшие биспецифичное антитело MF3755 xMF5816. В течение 6 недель мышам вводили по 0,5 мг биспецифичного антитела в неделю внутривенно в объеме инъекции 200 мкл (приблизительно 25 мг/кг в неделю) независимо от их веса. Контрольным мышам вводили PBS (200 мкл). После 6-недельного периода лечения рост опухоли наблюдали еще в течение 3-х недель. Если мыши достигали гуманной конечной точки, их умерщвляли раньше, чем через 63 дня.

Результаты:

Из 8 протестированных PDX-моделей рака желудка лечение биспецифичным антителом MF3755 xMF5816 значительно уменьшило рост опухоли в 6 моделях (фиг. 6a). Из этих 8 моделей 3 модели (GA0429, GA6833 и GA6891) продемонстрировали меньший объем опухоли в конце периода наблюдения, чем в начале лечения, что свидетельствует о сильном ингибировании опухоли биспецифичным антителом при раке желудка. Модель GA2434 дала некоторый ответ. Что касается PDX-моделей рака пищевода, все четыре протестированные модели отвечали на лечение биспецифичным антителом, при этом самый сильный ответ наблюдался у модели ES2356 (фиг. 6b). Результаты, демонстрирующие статистически значимую ($p < 0,0001$) эффективность лечения биспецифичным антителом MF3755 xMF5816, в этом примере были получены на модели ES11065.

Пример 2: Расширение когорты установленной дозы и эффективность антитела анти-EGFR x анти-LGR5 у пациентов с EAC, GAC и GEJAC:

Исследование фазы 1 с увеличением дозы при распространенных солидных опухолях

Дизайн исследования

Было проведено открытое многоцентровое исследование фазы 1 с частью с увеличением начальной дозы для определения рекомендуемой дозы фазы 2 (RP2D) биспецифичного антитела анти-EGFR x анти-LGR5 для лечения солидных опухолей у пациентов с mCRC с начальной дозой, представляющей собой фиксированную дозу 5 мг. После установления RP2D антитело дополнительно оценивают в части исследования с

расширением когорты установленной дозы, в том числе у пациентов с диагнозом EAC, GAC и GEJAC. У всех пациентов характеризуют безопасность, фармакокинетику, иммуногенность и предварительную противоопухолевую активность антитела, проводят анализы биомаркеров, включая статус EGFR и LGR5.

5

Увеличение дозы

В части с увеличением дозы участвуют пациенты с метастатической колоректальной аденокарциномой (mCRC), ранее получавшие в условиях метастазирования стандартную одобренную терапию, включающую оксалиплатин, иринотекан и фторпиримидин (5-FU и/или капецитабин), с антиангиогенным препаратом или без него, и анти-EGFR для лечения рака дикого типа по KRAS и NRAS, RASwt.

10

ФК-модель была создана на основе доступных данных о концентрации биспецифичного антитела в сыворотке, полученных в ходе предварительных исследований и токсикологических исследований на яванских макаках согласно GLP (надлежащая лабораторная практика). После аллометрического масштабирования эту модель использовали для прогнозирования экспозиции антитела у человека. Начальная доза антитела составляет 5 мг (фиксированная доза) в/в один раз каждые 2 недели с 4-недельными циклами. Будет исследовано до 11 уровней доз: 5, 20, 50, 90, 150, 225, 335, 500, 750, 1100 и 1500 мг (фиксированная доза). Вводимая доза, приращение дозы и частота дозирования для каждого пациента и каждой когорты могут быть изменены в зависимости от безопасности пациента, ФК- и ФД-данных, однако доза не будет превышать 4500 мг на цикл.

15

20

Дозолимитирующая токсичность (ДЛТ)

Любое из следующих клинических проявлений токсичности и/или отклонений лабораторных показателей, возникших в течение первого цикла (28 дней) и признанных исследователем связанными с лечением антителом, будет считаться ДЛТ:

- Гематологические токсичности:
- Нейтропения 4 степени (абсолютное количество нейтрофилов [АКН] $<0,5 \times 10^9$ клеток/л) в течение ≥ 7 дней
- Фебрильная нейтропения 3-4 степени
- Тромбоцитопения 4 степени
- Тромбоцитопения 3 степени, связанная с эпизодами кровотечения
- Другая гематологическая токсичность 4 степени
- Негематологические НЯ (нежелательные явления) 3-4 степени и токсичность по изменению лабораторных показателей, за исключением следующих:

30

35

- Инфузионные реакции 3-4 степени
- Кожная токсичность 3 степени, которая разрешается до ≤ 2 степени в течение 2 недель при оптимальном лечении.
- Диарея, тошнота и/или рвота 3 степени, которые разрешаются до ≤ 1 степени или исходного уровня в течение 3 дней при оптимальном лечении
- Нарушения электролитного баланса 3 степени, которые устраняются при оптимальном лечении в течение 48 часов
- Нарушения функции печени 3-4 степени продолжительностью ≤ 48 часов
- Любые нарушения функции печени, удовлетворяющие определению в законе Хая.
- Любая токсичность, связанная с исследуемым препаратом, продолжительностью ≥ 15 дней, препятствующая двум следующим введениям.

Расширение когорты установленной дозы

- 15 В части с расширением когорты установленной дозы биспецифичное антитело будет введено в RP2D пациентам с EAC, GAC или GEJAC. Как только RP2D будет определена, дополнительные пациенты будут получать лечение этой дозой и схемой для дальнейшей характеристики безопасности, переносимости, фармакокинетики и иммуногенности антитела, а также для проведения предварительной оценки
- 20 противоопухолевой активности и оценок биомаркеров. Известно, что злокачественные новообразования, лечение которых осуществляют, коэкспрессируют обе мишени (т. е. LGR5 и EGFR) и могут иметь ранее установленную чувствительность к ингибированию EGFR.
- 25 Лечение антителом у пациентов с EAC, GAC или GEJAC будет изучено, например, на 10-20 пациентах с каждым из диагнозов с потенциальным расширением когорты установленной дозы до 40 пациентов, при условии наличия признаков предварительной противоопухолевой активности). Безопасность RP2D будет постоянно оцениваться Комитетом по мониторингу безопасности (SMC) в ходе части исследования
- 30 с расширением когорты установленной дозы. При превышении частотой случаев ДЛТ заданного порога в 33% для какой-либо когорты включение в эту когорту будет приостановлено, и SMC проведет полный анализ безопасности, фармакокинетики и биомаркеров, чтобы определить, безопасно ли продолжить набор в эту когорту. При этом также будет исследована общая безопасность лекарственного средства.
- 35 Экспериментальная терапия и схема

Готовят препарат биспецифичного антитела анти-EGFRханти-LGR5 в виде прозрачного жидкого раствора для в/в инфузии. В/в инфузию проводят один раз каждые 2 недели с использованием стандартных процедур инфузии с начальной дозой 5 мг (фиксированная доза) и рекомендуемой дозой фазы 2 1500 мг (фиксированная доза). Увеличение дозы прекращали после достижения RP2D. Инфузии следует вводить в течение как минимум 4 часов во время цикла 1. Последующие инфузии после цикла 1 могут быть сокращены до 2 часов по усмотрению исследователя и при отсутствии инфузионных реакций.

- 5
- 10 Цикл считается равным 4 неделям. Для каждого пациента осуществляли 6-часовой период наблюдения после начала инфузии для начальной инфузии антитела, 4-часовой период для второй инфузии и минимум 2 часа для всех последующих введений, что соответствует по меньшей мере продолжительности инфузии. Антитело вводили в виде в/в инфузии продолжительностью от 2 до 4 часов один раз каждые 2
- 15 недели с 4-недельными циклами. День 1 последующего цикла наступал на 29 день или после выздоровления от любых нежелательных эффектов, связанных с предыдущим циклом.

Продолжительность лечения

- 20 Исследуемое лечение проводят до достижения подтвержденного прогрессирования заболевания (в соответствии с RECIST 1.1), неприемлемой токсичности, отзыва согласия, несоблюдения пациентом режима лечения, решения исследователя (например, при клиническом ухудшении) или прерывания приема антитела на > 6
- 25 недель подряд. Пациентов наблюдают на предмет безопасности в течение не менее 30 дней после последней инфузии антитела и до выздоровления или стабилизации всех сопутствующих токсических эффектов, а также на предмет прогрессирования заболевания и статуса выживаемости в течение 12 месяцев.

Оценки эффективности

- 30 Оценка опухоли основана на КТ/МРТ с контрастированием в соответствии с RECIST 1.1 (Eisenhauer et al., 2009 Eur J Cancer 45:228–247) каждые 8 недель после начала лечения. Объективные ответы должны быть подтверждены по меньшей мере через 4 недели после первого наблюдения. Остеосцинтиграфию проводят по клиническим показаниям для пациентов с метастазами в кости на исходном уровне или с
- 35 подозрением на поражение во время исследования. Опухолевые маркеры в циркулирующей крови, включая карциноэмбриональный антиген (СЕА), оценивают при скрининге и в 1 день каждого цикла.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое
5 содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и
переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в
лечении рака у субъекта, где указанное применение включает введение субъекту
фиксированной дозы 1500 мг указанного антитела или его функциональной части,
производного и/или аналога.
10
2. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое
содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и
переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в
лечении рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта.
15
3. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое
содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и
переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5, для применения в
лечении рака желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода у субъекта с
20 Her2-отрицательным статусом.
4. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения
по п. 2 или п. 3, где указанное применение включает введение субъекту
фиксированной дозы 1500 мг антитела или его функциональной части, производного
25 и/или аналога.
5. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения
по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его функциональную часть,
производное и/или аналог вводят внутривенно.
30
6. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения
по любому из предыдущих пунктов, где рак имеет мутацию в одном или более генах,
выбранных из TP53, MLH1, PIK3CA, CDKN2A, UGT1A, UGT1A8, BRAF, PTEN и KRAS,
предпочтительно где рак имеет мутацию в одном или более генах, выбранных из TP53,
35 MLH1, CDKN2A, UGT1A, UGT1A8, BRAF и PTEN.

7. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак имеет одну или более мутаций, выбранных из TP53 R196T; TP53 R342T; TP53 R248Q; MLH1 V384D; PIK3CA H1047R; CDKN2A W110T; UGT1A1 G71R; UGT1A8 G71R и KRAS G12C.

5

8. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где введения антитела или его функциональной части, производного и/или аналога осуществляют еженедельно, раз в две недели или ежемесячно.

10

9. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где введения антитела или его функциональной части, производного и/или аналога осуществляют один раз каждые 2 недели.

15

10. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R196T.

20

11. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R342T, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем MLH1, где мутация предпочтительно представляет собой V384D.

25

12. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, где мутация предпочтительно представляет собой R248Q, рак имеет мутацию в гене, кодирующем PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой H1047R, рак имеет мутацию в гене, кодирующем CDKN2A, где мутация предпочтительно представляет собой W110T, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация

30

предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.

35

13. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из пп. 1-12, где рак представляет собой рак пищевода, предпочтительно плоскоклеточную карциному пищевода (ESCC).

14. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак представляет собой рак желудка с мутацией в гене, выбранном из UGT1A1, UGT1A8 и/или PIK3CA.
- 5 15. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 6, где рак имеет мутацию в гене, кодирующем KRAS, где мутация предпочтительно представляет собой G12C, рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.
- 10 16. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 2, где рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A1, где мутация предпочтительно представляет собой G71R, и рак имеет мутацию в гене, кодирующем UGT1A8, где мутация предпочтительно представляет собой G71R.
- 15 17. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 10, где рак дополнительно имеет мутацию в PIK3CA, где мутация предпочтительно представляет собой E545K.
- 20 18. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из пп. 1-17, где рак представляет собой рак желудка.
- 25 19. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где VH-цепь переменного домена, связывающего EGFR, содержит аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF3755, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, включая инсерции, делеции, замены или их комбинацию, относительно
- 30 указанной VH; и где VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, содержит аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3; или аминокислотную последовательность VH-цепи MF5816, представленную на фиг. 3, имеющую не более 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций,
- 35 включая инсерции, делеции, замены или их комбинацию, относительно указанной VH.

20. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где переменный домен, связывающий LGR5, связывает эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 21-118 последовательности LGR5 человека, представленной на фиг. 1.

5

21. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 20, где аминокислотные остатки в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 LGR5 человека участвуют в связывании LGR5-связывающего переменного домена с LGR5.

10

22. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 20 или п. 21, где LGR5-связывающий переменный домен в меньшей степени связывается с белком LGR5, содержащим одну или более вариаций аминокислотных остатков, выбранных из 43A, 44A, 46A, 67A, 90A и 91A.

15

23. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где переменный домен, связывающий EGFR, связывает эпитоп, расположенный в пределах аминокислотных остатков 420-480 последовательности EGFR человека, представленной на фиг. 2.

20

24. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 23, где аминокислотные остатки в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 EGFR человека участвуют в связывании EGFR-связывающего переменного домена с EGFR.

25

25. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 23 или п. 24, где EGFR-связывающий переменный домен в меньшей степени связывается с белком EGFR, содержащим одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из I462A, G465A, K489A, I491A, N493A и C499A.

30

26. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где антитело характеризуется повышенной АЗКЦ.

35

27. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предыдущих пунктов, где антитело является афукозилированным.

28. Способ лечения желудка, пищевода или пищеводно-желудочного перехода, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которое содержит переменный домен, связывающий внеклеточную часть EGFR, и переменный домен, связывающий внеклеточную часть LGR5.
- 5
29. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения или способ по любому из предыдущих пунктов, где лечению антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом предшествует этап диагностики Her2-статуса субъекта.
- 10
30. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог по п. 29, где диагностику осуществляют путем ISH- или ИHC-тестирования Her2-статуса.

Фиг. 1

SEQ ID NO: 1

```

                                40          50          60
MDTSR LGVLL SLPVL LQLAT GGSSP RSGVL LRGCP THCHC EPDGR MLLRV DCSDL GLSEL
                                90          100         110         120
PSNLS VFFTSY LDLSM NNISQ LLPNP LPSLR FLEEEL RLAGN ALTYI PKGAF TGLYS LKVLM
                                                180
LQNNQ LRHVP TEALQ NLRSL QSLRL DANHI SYVPP SCFSG LHSLR HLWLD DNALT EIPVQ
                                                240
AFRSL SALQA MTLAL NKIHH IPDYA FGNLS SLVVL HLHNN RIHSL GKKCF DGLHS LETLD
                                                300
LNYNN 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 SFPIT 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 FGSEFA RHGAW WENGV GCHVI GFLSI FASES SVFLL TLAAL
                                                720
ERGFS VKYSA KFETK APFSS LKVII LLCAL LALTM AAVPL LGGSK YGASP LCLPL PFGEP
                                                780
STMGY MVALI LLNSL CFLMM TIAYT KLYCN LDKGD LENIW DCSMV KHIAL LLETN CILNC
                                                840
PVAFL SFSSL INLTF ISPEV IKFIL LVVVP LPACL NPLLY ILFNP HFKED LVSLR KQTYV
                                                900
WTRSK HPSLM SINSD DVEKQ SCDST QALVT FTSSS ITYDL PPSSV PSPAY PVTES CHLSS

VAFVP CL

```

Фиг. 2

SEQ ID NO: 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 KDSLS
                400
INATN IKHFK NCTSI SGDLH ILPVA FRGDS FTHTP PLDPQ ELDIL KTVKE
ITGFL LIQAW PENRT DLHAF ENLEI IRGRT KQHGQ 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 LLLVV ALGIG LFMRR RHIVR KRTLK RLLQE RELVE PLTPS GEAPN
QALLR ILKET EFKKI KVLGS GAFGT VYKGL WIPEG EKVKI PVAIK ELREA
                800
TSPKA NKEIL DEAYV MASVD NPHVC RLLGI CLTST VQLIT QLMPE GCLLD
YVREH KDNIG SQYLL 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 IEFSE MARDP QRYLV IQGDE RMHLP SPTDS NFYRA
LMDEE DMDDV VDADE YLIPQ QGFFS SPSTS RTPLL SSLSA TSNNS TVACI
                1100
DRNGL QSCPI KEDSF LQRYE 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 а)

SEQ ID NO:	MF	Мишень	VH
3	3370	EGFR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF ^T SYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHWWLDAFDYWGQGTLVTVSS
4	3755	EGFR	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDF ^T NYAMNWVRQAPGHGLEWMGWINANTGDPTYAQGF ^T GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHF ^T DYWGQGTLVTVSS
5	4280	EGFR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS ^G YTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEY ^G KTFFAQNF ^T QGRVTMTEDTSADTAYMELSSLRSED ^T AVYYCATEGY ^E YET ^T TYYYNLFDSWGQGTLVTVSS
6	4289	EGFR	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC ^K TSGYTF ^T TDYAMTWVRQAPGQGLEWMGWIT ^T NTGDPTYAPGFT ^T GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYHWIRGF ^E FEFWGQGTLVTVSS
7	5790	LGR5	QVQLQESG ^P GLVKPSETLSLTCTVSGGSFSSSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSFY ^S SGNTYYNPSLKS ^R V ^T ISED ^T SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQTYSSSWDGVLYYFDYWGQGTLVTVSS
8	5803	LGR5	QVQLQESG ^P GLVKPSETLSLTCTVSN ^G SISTYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYTGR ^T TKYNPSLKS ^R V ^T ISVD ^T SKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARGGIVVVPAARDY ^Y YMDVWGKGTTVTVSS
9	5805	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKLACKGSGFS ^T SHWIGWVRQK ^P GRGLEWMGVIYPGDS ^D TRYSPSFQ ^G QVTVSADKSINTAYLQWNSL ^K ASDTAIYYCARPNSGSPRY ^F FEFWGRGTLVTVSS

Фиг. 3 а) (продолжение)

10	5808	LGR5	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQEYYGSGSPSYFDYWGQGTLVTVSS
11	5809	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGDSFISHWIAWVRQMPGKGLEWMGIVYPGSDTRYSPSFQG QVTISADKSITTAFLQWSSLKASDTAMYYCARHEWELLGPFDYWGQGTLVTVSS
12	5814	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTSTNDASWVRQTPGQGLEWMGSIIPILDTTDHAQKFQG RVTITADKSTNTAYMELNSLRSDDTAVYYCAREHIAARQDYFDYWGQGTLVTVSS
13	5816	LGR5	EVQLVQSGSKLKKPGASVKVSCKASGYTFSTYTMNWVRQAPGQGLEWMGWINTDTGDPTYAQGFT GRFVFSLDTSVSTAFLQINSLKAEDTAVYYCARGDCDSTSCYRYSYGYEDYWGQGTLVTVSS
14	5817	LGR5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSGGTFRSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFDTRNYAQILQGR VTTITADLSTSTAYMELNSLRSEDTAIYYCARGSDEGDWFDPWGQGTLVTVSS
15	5818	LGR5	EVQLVQSGTEVRKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIIPILGTTDHAQKFQD RVTITADKSSNTTYMELSSLRSDDTAVYYCAREYLAARLDYFDSWGQGTLVTVSS

Фиг. 3 б)

MF	Мишень	SEQ ID NO:	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4
3370	EGFR	16-22	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYGIS	WVRQAPGQGLEW MG	WISAYNGNTNYA QKLG	RVTMTDITSTAYMELR SLRSDDTAVYYCAK	DRHWHWLDADF DY	WGQGLVT VSS
3755	EGFR	23-29	QVQLVQSGSELKKPG ASVKISCKASGYDFT	NYAMN	WVRQAPGHG LEWMG	WINANTGDPT YAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQ ISSLKAEDSAVYYCTR	ERFLEWLHF DY	WGQGLT VTVSS
4280	EGFR	30-36	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKVSGYTLT	ELSMH	WVRQAPGKG LEWMG	GFDPEYGKTF FAQNFQG	RVTMTEDTSADTAYM ELSSLRSEDTAVYYCA T	EGYYETTTY YNLFDS	WGQGLT VTVSS
4289	EGFR	37-43	QVQLVQSGSELKKPG ASVKVCKTSGYTFT	DYAMT	WVRQAPGQG LEWMG	WITNTGDPT YAPGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQ ISSLKAEDTAVYYCAR	VYHWIRGFE F	WGQGLT VTVSS
5790	LGR5	44-50	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSFS	SSSSYWG	WIRQPPGKGL EWIG	SFYYSNTYY NPSLKS	RVTISEDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	QTYSSWDG VLYYFDY	WGQGLT VTVSS
5803	LGR5	51-57	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSNNGSIS	TYYWS	WIRQPPGKGL EWIG	YVYYTGRTKY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLN LSSVTAADTAVYYCAR	GGIVVPAAR DYYYMDV	WGKGT VTVSS
5805	LGR5	58-64	EVQLVQSGAEVKKPG ESLKIACKGSGFSFT	SHWIG	WVRQKPRG LEWMG	VIYPGDSR YSPSFQG	QVTVSADKSINTAYLQ WNSLKASDTAIYYCAR	PNSGSPRYFE F	WGRGT VTVSS
5808	LGR5	65-71	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SSSYWG	WIRQPPGKGL EWIG	SFYYSNTYY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	QEYYGSGS PSYFDY	WGQGLT VTVSS

Фиг. 3 б) (продолжение)

5809	LGR5	72-78	EVQLVQSGAEVKKPG ESLKISCKGSGDSFI	SHWIA	WVRQMPGKG LEWMG	IVYPGDSSTR YSPSFQG	QVTISADKSITTAYLQ WSSLKASDTAMYICA R	HEWELLGPF DY	WGQGTL VTVSS
5814	LGR5	79-85	EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGGTST	NDAIS	WVRQTPGQG LEWMG	SIIPILDTHD AQKFQG	RVTITADKSTNTAYME LNSLRSDDTAVYYCAR	EHIAARQDY FDY	WGQGTL VTVSS
5816	LGR5	86-92	EVQLVQSGSKLKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYTMN	WVRQAPGQG LEWMG	WINTDTGDPT YAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAFLLQ INSLKAEDTAVYYCAR	GDCDSTSCY RYSYGYEDY	WGQGTL VTVSS
5817	LGR5	93-99	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKVSGGTFR	SYAIS	WVRQAPGQG LEWMG	GIPIFDTRNY AQILQG	RVTITADLSTSTAYME LNSLRSEDTAVYYCAR	GSDEGDWFD P	WGQGTL VTVSS
5818	LGR5	100- 106	EVQLVQSGTEVRKPG SSVKVSCKASGGTFS	NYAIS	WVRQAPGQG LEWMG	SIIPILGTHD AQKFQD	RVTITADKSSNTTYME LSSLRSDDTAVYYCAR	EYIAARLDYF DS	WGQGTL VTVSS

Фиг. 3 с)

MF1337: SEQ ID NO: 107

gaggtgcagctggtggagactggggtgaggtgaagaagccggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
 ettctgactacatcttaccaaatatgacatcaactgggtgcgacaggccctggacaagggttgaatg
 gatgggatggatgagcgctaacactggaaacacgggctatgcacagaagtccagggcagagtcaccatg
 accagggacacgtccataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggcgttt
 attctgtgagaggtagtctttcaagacagagacggcgcctactatacttctgctctggacgtctg
 gggccaagggaccacggtcaccgtctccagt

MF3370: SEQ ID NO: 108

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
 ettctggttacaccttaccagctatggtatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggttgaatg
 gatgggatggatcagcgcttacaatggtaacacaaactatgcacagaagtccagggcagagtcaccatg
 accacagacacatccagcagcagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacaggtgtgt
 attactgtgcaaaagatcgtcattggcattggtggtggacgcctttgattattggggccaaggtacct
 ggtcaccgtctccagt

MF3755: SEQ ID NO: 109

caggtgcagctggtgcagctctgggtctgagttgaagaagcctggggcctcagtgaagattctctgcaagg
 ettctggatacagcttactaactatgctatgaattgggtgcgacaggccctggacaagggttgaatg
 gatgggatggatcaacgccaacactggggacccaacgtatgccagggttcacaggacggtttgtcttc
 tcttggacacctctgtcagcagcgcatactgcagatcagcagtttaaggctgaggactctgccgtgt
 attactgtacgagagagcgattttggagtggttacactttgactactggggccagggaaccctggcac
 cgtctccagt

MF4280: SEQ ID NO: 110

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
 tttccggatacacctcactgaattatccatgcactgggtgcgacaggctcctggtaaagggttgaatg
 gatgggaggtttgatctgagtatggtaaaacattcttcgacagaacttcagggcagagtcaccatg
 accgaggacacatctgcagacacagcctacatggagctaagcagcctgagatctgaggacacggcctgt
 attactgtgcaacagaggggtattatgagactactactattaactacaaccttttgactcctggggcca
 gggaaacctggtcaccgtctccagt

MF4289: SEQ ID NO: 111

caggtgcagctggtgcaatctgggtctgaattgaagaagcctggggcctcagtgaaggttctctgcaaga
 ettctggatacaccttactgactatgctatgactgggtgcgacaggccctggacaagggttgaatg
 gatgggatggatcaccaccaacactggggacccaacgtatgcccgggcttcacaggacggtttgtcttc
 tcttggacacctctgtcagcagcgcatactgcagatcagcagcctaaaggccgaggacactgccgtat
 attactgtgagagagtgtatcattggatacggggatttgagtttggggccagggaacctggtcaccgt
 ctccagt

MF5790: SEQ ID NO: 112

caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcggagacctgtccctcacctgcaactg

Фиг. 3 с) (продолжение)

tctctgggtggtccttcagcagtagtagttcctactggggctggatccgccagccccaggggaaggggt
 ggagtggattgggagtttctattatagtgggaaacactactacaacccgtccctcaagagtcagtcacc
 atateccaagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccagacacggctg
 tgtattactgtgcgagacagacgtatagcagcagctgggacggggctctgtactactttgactactgggg
 ccagggaaacctggtcaccgtctccagt

MF5803: SEQ ID NO: 113

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcactgcactg
 tctctaatggtccatcagtaactactactggagctggatccggcagccccaggggaaggggtggagtg
 gattggatatgtctattacactgggcgcaccaagtacaacccctccctcaagagtcagtcaccatca
 gtgacacgtccaagaaccagttctccctgaacctgagttctgtgaccgctgcggacacggccgtgatt
 actgtgcgagaggggggtattgtagtagtccagctgcgcgggactattactactacatggacgtctgggg
 caaagggaccacggtcaccgtctccagt

MF5805: SEQ ID NO: 114

gaggtgcaactggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagccccggggagtctctgaagatccctgtaagg
 gttctggattcagttttaccagccactggatccgctgggtgcgccagaagccccgggagaggcctggagtg
 gatgggggtcatctatcctggtgactctgataccagatacagcccgtcctccaaggccaggtcaccgtc
 tcagccgacaagtcataataaccgctacctgcagtggaacagcctgaaggcctcggacaccgccat
 attactgtgcgagaccgaacagtgaggagtcccccggtacttcagttctggggcctggcacccctggtae
 cgtctccagt

MF5808: SEQ ID NO: 115

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcactgcactg
 tctctgggtggtccatcagcagtagtagttactactggggctggatccgccagccccaggggaaggggt
 ggagtggattgggagtttctattatagtgggaaacactactacaacccgtccctcaagagtcagtcacc
 atatecctgacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccagacacggctg
 tgtattactgtgcgagacaggagtattactatggttcggggagtccttcgtactactttgactactgggg
 ccagggaaacctggtcaccgtctccagt

MF5809: SEQ ID NO: 116

gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagccccggggagtctctgaagatctctgtaagg
 gttctggagacagttttatcagccactggatccctgggtgcgccagatgcccggaaggcctggagtg
 gatggggatcgtctatcctggtgactctgataccagatacagcccgtcctccaaggccaggtcaccatc
 tcagccgacaagtcataaccaccgctacttgcagtgaggcagcctgaaggcctcggacaccgccatgt
 attactgtgcgagacacagtgaggaaactacttggcccccttgactactggggccagggaaacctggtae
 cgtctccagt

MF5814: SEQ ID NO: 117

gaggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctctgcaagg
 cttctggagcaccctccactaacgatctatcagttgggtgcgacagaccctggacaagggttgagtg
 gatgggaagtatccctatccttgatacaacagaccacgcacagaagttccagggcagagtcacgatt
 acccgggacaaatccacgaacacagcctacatggagctgaacagcctgagatctgatgacacggccgtg
 attactgtgcgagagagcatatagcagctcgtcaggactactttgactattggggccagggaaacctgggt

Фиг. 3 с) (продолжение)

caccgtctccagt

MF5816: SEQ ID NO: 118

gaggtgcagctggtgcagtctgggtctaaattgaagaagcctggggcctcagtgaaggttctctgcaagg
cttctggatacaccttcaactagetatactatgaattgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaacaccgacactggggaccaacgtatgccagggcttcacaggacggttgtcttc
tccttggacacctctgtcagcagggcatttctacagatcaacagcctaaaggetgaggacactgcccgat
attactgtgcgagaggagattgtgatagtagcagctgctatagatacagttatggttacgaggactactg
gggccagggaaacctgggtcaccgtctccagt

MF5817: SEQ ID NO: 119

caggtgcagctggtgcagtctgggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctctgcaagg
tttctggaggaaccttcaggagctatgctatcagctgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggagggateatccctatctttgatacaagaactacgcacagattcttcagggcagagtcacgatt
accgggacttatccacgagcacagcctacatggagctgaacagctctgagatctgaggacacggccattt
attactgtgcgagagggagcagcagggggactggttcgacctggggccaaggaacctgggtcaccgt
ctccagt

MF5818: SEQ ID NO: 120

gaggtgcagctggtgcagtctgggactgaggtgaggaagcctgggtcctcggtgaaggtctctgcaagg
cttctggaggaaccttcagcaactatgctatcagctgggtgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggaagtatcatccctatccttggacaacagaccacgcacagaagtccaggacagagtcacgatt
accgggacaaaatcctcgaacacaacctacatggagctgagcagcctgagatctgatgacacggccgat
attactgtgcgagagagtatatagcagctcgtctggactactttgactcttggggccagggaaacctgggt
caccgtctccagt

Фиг. 4

a) SEQ ID NO: 121

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

b)

SEQ ID NO: 122

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 123

gacatccagatgaccagtgctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagca
 ttagcagctacttaaattgggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgg
 ggtccatcaagggtcagtgccagtggtatctgggacagattcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaactt
 actactgtcaacagagttacagtaccctccaacgttcggccaagggaccaaggtggagatcaaa

c)

SEQ ID NO: 124

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 125

gaactgtggctgaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgetga
 ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaategggttaactcccaggagagtgtcaca
 gaggcaggacagaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc
 tacgctgcaagtcaccatcaggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg

d)

SEQ ID NO: 126

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
 SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

e)

CDR1 - QSISSY, SEQ ID NO: 127

CDR2 – AAS, SEQ ID NO: 128

CDR3 – QQSYSTPPT, SEQ ID NO: 129

Фиг. 5

a)

CH1:

SEQ ID NO: 130

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcgccctggggtgctggt
 caaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggtgacaccttccggctgtcta
 cagtctcaggactctactcctcagcagcgtgacgctgcccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaa
 tcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt

SEQ ID NO: 131

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

b)

Шарнир:

SEQ ID NO: 132

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcca

SEQ ID NO: 133

EPKSCDKTHTCPPCP

c)

CH2:

SEQ ID NO: 134

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO: 135

gcacctgaactctggggggaccgctcagtcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggt
 cacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg
 ccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtcagegtctcaccgtctgaccaggactggetg
 aatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccacgagaaaaccatctccaaagccaaa

Фиг. 5 d)

CH3: L351K и T366K

SEQ ID NO: 136

GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG-

SEQ ID NO: 137

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgaagtgcct
ggtaaaaggttttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctc
ccgtgctggactccgacggtccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctc
atgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtga

e)

CH3: L351D и L368E

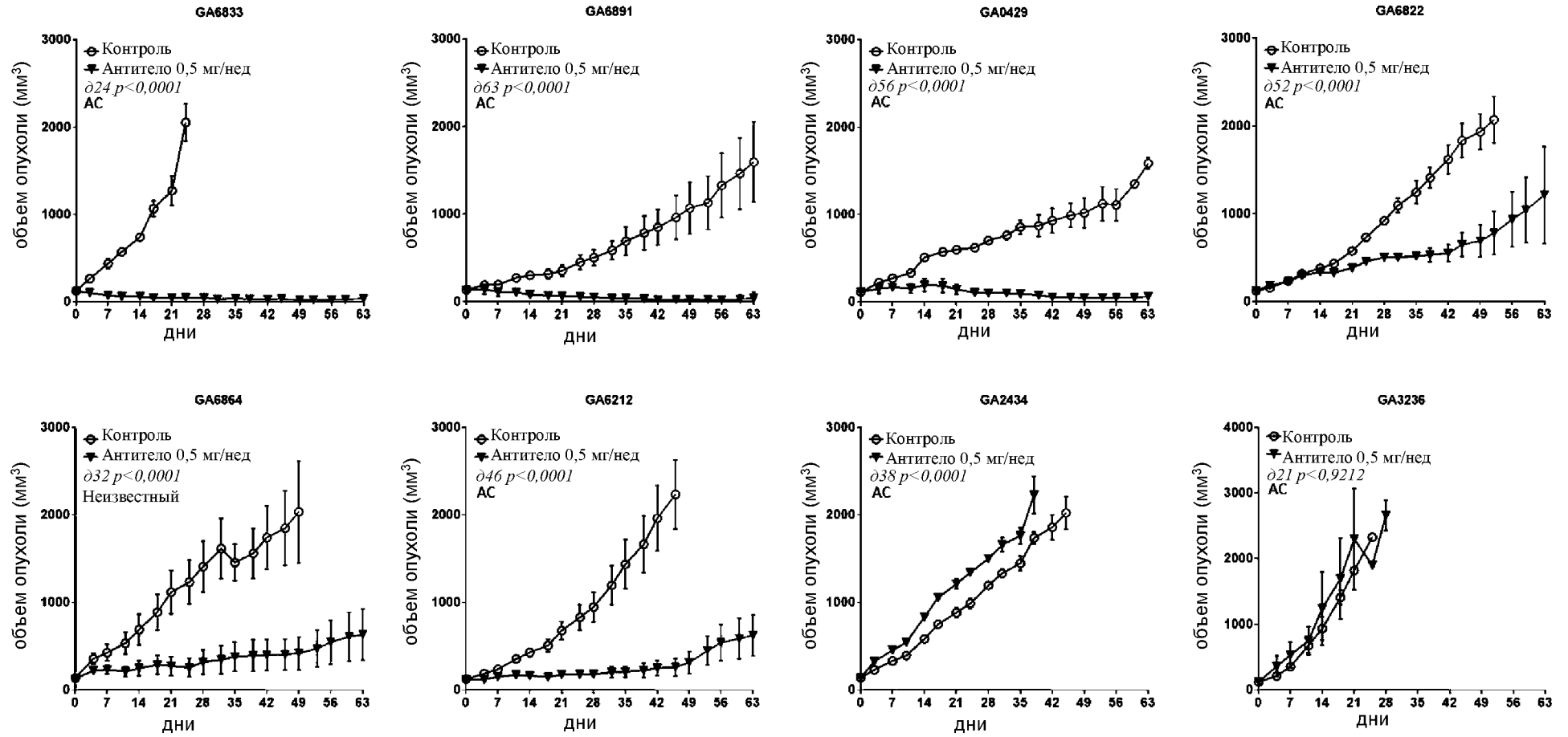
SEQ ID NO: 138

GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG-

SEQ ID NO: 139

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgacccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcga
ggtaaaaggttttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctc
ccgtgctggactccgacggtccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctc
atgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtga

Фиг. 6 а)



Фиг. 6 б)

