

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390658 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.06

(22) Дата подачи заявки  
2021.08.25

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 33/24 (2019.01)  
A61K 31/5377 (2006.01)  
A61K 31/437 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С МУТАЦИЯМИ EGFR

(31) 63/069,748

(32) 2020.08.25

(33) US

(86) PCT/IB2021/057794

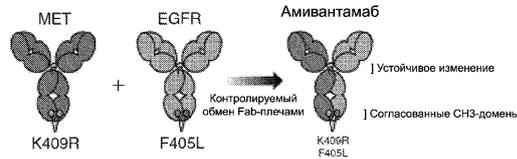
(87) WO 2022/043895 2022.03.03

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

(72) Изобретатель:  
Кноблаух Роланд, Мурс Шери (US)

(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к лечению субъектов, имеющих вставку экзона 20 в EGFR и другие необычные мутации EGFR.



202390658

A1

A1

202390658

## ЛЕЧЕНИЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С МУТАЦИЯМИ EGFR

### 5 ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6371WOPCT1SEQLIST.txt, с датой создания 10 2 августа 2021 г. и размером 19 Кб. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лечению субъектов, имеющих вставку 15 экзона 20 в EGFR и другие необычные мутации EGFR.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Индивидуальные роли рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и фактора мезенхимально-эпителиального перехода рецепторной тирозинкиназы (с- 20 Met) при раке точно установлены, что делает эти цели привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора передают сигнал через одни и те же пути выживания и антиапоптотические пути (ERK и АКТ); таким образом, совместное ингибирование этой пары может ограничивать потенциал активации компенсаторного пути, тем самым повышая общую эффективность.

Молекулярная сегментация немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) на 25 поздней стадии, основанная на драйверной мутации в онкогенах, позволила улучшить общую выживаемость и качество жизни у пациентов с терапевтически значимыми драйверными мутациями, получающих нацеленную терапию злокачественной солидной опухоли. Мутации в гене EGFR (1,2) конститутивно активируют нисходящие сигнальные пути роста и выживаемости, что приводит к 30 зависимости роста опухоли от пути EGFR. Почти у 20% представителей белой европеоидной расы и до 50% представителей монголоидной расы встречаются скрытые мутации аденокарциномы легкого в EGFR (Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al. Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs. Jama-J Am Med Assoc 2014;311(19):1998-2006; Travis WD. 2015

WHO Classification of the Pathology and Genetics of Tumors of the Lung. *Journal of Thoracic Oncology* 2015;10(9):S68-S).

Сообщалось об активирующих мутациях EGFR в первых четырех экзонах (18–21), которые приводили к изменениям в их тирозинкиназном домене. НМПЛ, которые содержат «классические» мутации EGFR в экзонах 18, 19 и 21, например делецию экзона 19 или L858R, чувствительны к лечению ингибиторами тирозинкиназы (TKI) EGFR первого, второго и третьего поколений, такими как эрлотиниб, афатиниб и осимертиниб (Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009;28 Suppl 1; Tsigelny IF et al. Molecular determinants of drug-specific sensitivity for epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 19 and 20 mutants in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2015;6(8):6029-39; Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal transduction and targeted therapy* 2019;4:5; Zhong WZ, Zhou Q, Wu YL. The resistance mechanisms and treatment strategies for EGFR-mutant advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8(41):71358-70). Напротив, мутации экзона 20 в EGFR охватывают нуклеотиды, которые преобразуются в аминокислоты в положениях 762–823, и включают в себя С-спираль (762–766), а затем петлю (767–775) (Yasuda H, et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Science translational medicine* 2013;5(216):216ra177). Мутации со вставкой от одной до семи аминокислот в экзоне 20 образуют клин в конце С-спирали в EGFR, который промотирует конформацию активной киназы. Драйверные мутации со вставкой в экзоне 20 EGFR (Exon20ins), отдельное и высокогетерогенное подмножество НМПЛ, составляют 4–12% всех мутаций EGFR (Yasuda H, et al. *Sci Transl Med* 2013;5(216); Russo A, et al. Heterogeneous Responses to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Patients with Uncommon EGFR Mutations: New Insights and Future Perspectives in this Complex Clinical Scenario. *Int J Mol Sci* 2019;20(6); Riess JW, et al. Diverse EGFR Exon 20 Insertions and Co-Occurring Molecular Alterations Identified by Comprehensive Genomic Profiling of NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* 2018;13(10):1560-8). Эти мутации Exon20ins по существу нечувствительны к одобренным TKI EGFR и ассоциируются с плохим прогнозом; таким образом, они представляют собой область с высокой неудовлетворенной медицинской потребностью (Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR

exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Tar* 2019;4; Oxnard GR, et al. Natural History and Molecular Characteristics of Lung Cancers Harboring EGFR Exon 20 Insertions. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8(2):179-84).

Кроме того, сообщалось о других необычных активирующих мутациях EGFR, таких как S768I, L861Q и G719X, у пациентов с НМРЛ. Необычные мутации EGFR демонстрируют изменчивую эффективность нацеленных на EGFR лекарственных средств в зависимости от молекулярных изменений в экзонах 18–21, которые все еще не являются полностью изученными. Мутации по типу замены G719X в экзоне 18 (где X могут представлять собой аминокислоту, отличную от G), L861Q в экзоне 21 и S768I в экзоне 20 представляют собой наиболее часто встречающиеся мутации среди необычных мутаций. Отсутствует полный консенсус в отношении стратегии лечения этой популяции (Zhang T et al. Treatment of uncommon EGFR mutations in non-small cell lung cancer: new evidence and treatment. *Transl Lung Cancer Res.* 2019 Jun;8(3):302-316).

В последнее время клиническую оценку для пациентов, опухоли которых содержат мутации Exon20ins EGFR, проходят позитиниб и ТАК-788 (Yang ZD, et al. A phase 2 study of poziotinib in patients with EGFR or HER2 exon 20 mutation-positive non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2018;36(15); Janne PA, et al. Antitumor activity of TAK-788 in NSCLC with EGFR exon 20 insertions. *J Clin Oncol* 2019;37(15)). Несмотря на изначально многообещающую эффективность, FDA (США) отказалось признать позитиниб новым препаратом в качестве терапии прорыва из-за низкой доли ответов (~ 14%) у пациентов с НМРЛ, имеющих мутации Exon20ins EGFR. Кроме того, и позитиниб, и ТАК-788 приводили к высоким уровням токсичности, ассоциированным с EGFR дикого типа, что обуславливалось отсутствием селективности в отношении Exon20ins EGFR по сравнению с EGFR дикого типа, что ограничивало их клиническую эффективность (Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Tar* 2019;4).

Таким образом, существует потребность в улучшенных терапевтических средствах или комбинации терапевтических средств для разработки более эффективного лечения EGFR- или с-Met-положительных онкологических заболеваний, имеющих Exon20ins и другие необычные мутации.

## **ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) /  
5 рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.

В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X, включающий введение терапевтически эффективного количества  
10 выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении этой мутации.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, с биспецифическим антителом к EGFR/с-Met, включающий:

- 15
- a) получение биологической пробы субъекта;
  - b) определение наличия или отсутствия мутации экзона 20 в EGFR в пробе; и
  - c) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет мутацию экзона 20 в EGFR.

20 В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, с биспецифическим антителом к EGFR/с-Met, включающий:

- a) получение биологической пробы субъекта;
- b) определение наличия или отсутствия мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X в пробе; и
- 25 c) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет указанную мутацию.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первый домен, который специфически связывается с EGFR, и второй домен, который специфически связывается с с-Met, причем первый домен  
30 содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, и при этом второй домен, который связывается с с-Met, содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ

ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления первый домен, который специфически связывается с EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 13 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14, а второй домен, специфически связывающийся с c-Met, содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1.

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

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит биантенарную структуру гликанов с содержанием фукозы в диапазоне от около 1% до около 15%.

В одном варианте осуществления у субъекта наблюдается рецидив или резистентность к лечению одной или более предшествующими противораковыми терапиями.

В одном варианте осуществления одна или более предшествующих противораковых терапий содержат один или более химиотерапевтических препаратов, ингибиторов контрольной точки, нацеленные противораковые терапии, или ингибиторы киназы, или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления одна или более предшествующих противораковых терапий содержат карбоплатин, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, винорелбин, доцетаксел, паллиадин, кризотиниб, ингибитор оси PD-(L)1, ингибитор EGFR, ингибитор c-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR, ингибитор AXL, эрлотиниб, gefitinib, lapatinib, vandetanib, afatinib, osimertinib, лазертиниб, poziotinib, криотиниб, cabozantinib, capmatinib, axitinib, lenvatinib, nintedanib, regorafenib, pazopanib, sorafenib, или sunitinib, или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления субъект ранее не получал лечение.

Активирующая EGFR мутация содержит замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую

аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746–A750, делецию R748–P753, вставку Ala (A) между M766 и A767, вставку Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, вставку Asp и Ser (NS) между P772 и H773, вставку одной или более аминокислот между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, одну или более делеций в экзоне 20 EGFR, или одну или более вставок в экзоне 20 EGFR, или любую их комбинацию. Субъекты с мутациями экзона 20 в EGFR (вставка одной или более аминокислот) по существу устойчивы к ингибиторам тирозинкиназы (TKI) EGFR (см. международную патентную публикацию № WO2018/094225).

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, рак желудка, колоректальный рак, рак головного мозга, рак, происходящий из эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC), или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или аденокарциному легкого, легочную саркоматоидную карциному или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления способ настоящего описания содержит дополнительное получение субъектом одной или более противораковых терапий.

В одном варианте осуществления одна или более противораковых терапий представляют собой химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, нацеленную противораковую терапию, ингибитор киназы или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, ингибитор c-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR или ингибитор AXL.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позиотиниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

5 В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой мутацию *de novo*.

В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой приобретенную мутацию.

10 В одном варианте осуществления мутация EGFR S768I, L861Q и/или G719X представляет собой мутацию *de novo*. В одном варианте осуществления мутация EGFR S768I, L861Q и/или G719X представляет собой приобретенную мутацию. В одном варианте осуществления X представляет собой любую аминокислоту, отличную от G. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719A. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719S. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719C. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719D.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе от около 140 мг до около 1750 мг.

20 В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 700 мг, около 750 мг, около 800 мг, около 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг или 1400 мг.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе примерно 1050 мг.

25 В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе примерно 1400 мг.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

30

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На **ФИГ. 1А–1Ж** представлена супрессия сигнальных путей EGFR и c-Met в клетках Ва/Ф3 с мутациями Exon20ins EGFR с помощью амивантамаба.

На **ФИГ. 1А** представлена схема структуры амивантамаба, биспецифического

антитела к EGFR и cMet; на **ФИГ. 1Б** представлена схема вставок экзона 20 в EGFR в стабильных клетках Ва/Ф3, модели PDC, PDO и PDX; на **ФИГ. 1В** представлена жизнеспособность клеток Ва/Ф3, стабильно экспрессирующих Exon20ins EGFR (V769\_D770insASV, D770delinsGY, H773\_V774insH, Y764\_V765insHH и D770\_N771insSVD), после лечения амивантамабом, гефитинибом или осимертинибом; на **ФИГ. 1Г** показаны уровни белка в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих указанные мутации Exon20ins в EGFR, после лечения амивантамабом в течение 72 часов в указанных концентрациях; на **ФИГ. 1Д** показаны уровни белка в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих указанные мутации Exon20ins в EGFR, после лечения осимертинибом или гефитинибом в течение 6 часов в указанных концентрациях; на **ФИГ. 1Е** представлено распределение фаз клеточного цикла в клетках Ва/Ф3, экспрессирующих мутации Exon20ins в EGFR D770delinsGY или H773\_V774insH, после лечения амивантамабом; на **ФИГ. 1Ж** показаны уровни белка в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих указанные мутации Exon20ins в EGFR, после лечения амивантамабом.

На **ФИГ. 2А–2Д** представлена супрессия сигнальных путей EGFR и cMet в полученных у пациента клетках (PDC) и органоидах (PDO), несущих мутации Exon20ins в EGFR. На **ФИГ. 2А** показаны уровни белка в PDC с указанными мутациями Exon20ins в EGFR после лечения амивантамабом в течение 72 часов в указанных концентрациях; на **ФИГ. 2Б** представлена жизнеспособность клеток PDC, определенная с помощью CellTiter-Glo, после лечения амивантамабом в течение 72 часов; на **ФИГ. 2В** представлено влияние амивантамаба на клеточную пролиферацию PDC, измеренную в процентах (%) оптической плотности (ОП). \*P < 0,0001, \*\*P < 0,001; t-критерий Стьюдента; на **ФИГ. 2Г** представлены кривые зависимости доза-ответ для PDO YUO-036 (A767\_V769dup) после лечения контрольным IgG1 или амивантамабом; на **ФИГ. 2Д** представлены кривые зависимости доза-ответ для PDO YUO-029 (S768\_D770dup) после лечения контрольным IgG1 или амивантамабом.

На **ФИГ. 3А–3В** представлена интернализация EGFR и cMet в клетках Ва/Ф3 и PDC, экспрессирующих мутации Exon20ins в EGFR, после лечения амивантамабом. На **ФИГ. 3А** представлена экспрессия PE-EGFR и FITC-cMet на цитоплазматической мембране, определенная в клетках DFCI-127 (P772\_H773insPNP); на **ФИГ. 3Б** представлена экспрессия PE-EGFR и FITC-cMet

на цитоплазматической мембране, определенная в клетках DFCI-58 (H773\_V774insNPH); на **ФИГ. 3В** показаны уровни белка в клеточных линиях Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY или H773\_V774insH, после предварительного лечения ингибитором аутофагии бафиломицином (100 нМ) в течение 30 мин, а затем амивантамабом (1 мг/мл).

На **ФИГ. 4А–4И** показано снижение опухолевой нагрузки в клетках Ва/Ф3 и PDC с использованием моделей на основе ксенотрансплантата Exon20ins в EGFR после лечения контрольным IgG1 или амивантамабом два раза в неделю посредством в/б инъекций в дозировке 30 мг/кг; \*P < 0,0001 по сравнению с несущей средой или контрольным IgG1. На **ФИГ. 4А** показаны объемы опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями клеток Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY или H773\_V774insH; на **ФИГ. 4Б** показано изменение в процентах объемов опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями клеток Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY или H773\_V774insH, по состоянию на последний день лечения в мышинной модели ксенотрансплантата; на **ФИГ. 4В** показаны уровни белка в лизатах опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями клеток Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY или H773\_V774insH; на **ФИГ. 4Г** показаны объемы опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями DFCI-127; на **ФИГ. 4Д** показано изменение в процентах объемов опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями DFCI-127, по состоянию на последний день лечения; на **ФИГ. 4Е** показаны уровни белка в лизатах опухолей у NOG-мышей, являющихся носителями DFCI-127, получивших лечение несущей средой или амивантамабом; на **ФИГ. 4Ж** показаны объемы опухолей у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163; на **ФИГ. 4З** показано изменение в процентах объемов опухолей у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, по состоянию на последний день лечения; на **ФИГ. 4И** показаны уровни белка в лизатах опухолей у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, получивших лечение несущей средой или амивантамабом.

На **ФИГ. 5А–5Д** продемонстрирована более высокая ADCC-активность амивантамаба по сравнению с цетуксимабом. На **ФИГ. 5А** продемонстрирована ADCC-активность, опосредованная амивантамабом, против клеток PDC НМРЛ, экспрессирующих мутации Exon20ins в EGFR, с использованием РВМС, соотношение Е : Т (50 : 1); на **ФИГ. 5Б** представлены результаты количественного

анализа опосредованной амивантамабом цитотоксичности к клеткам PDC DFCI-127 и YU-1163 после лечения IgG1, амивантамабом (10 мкг/мл) или цетуксимабом (10 мкг/мл) в течение 24 часов в присутствии или отсутствии РВМС, соотношение Е : Т (5 : 1); на **ФИГ. 5В** показано ослабление опосредованных амивантамабом (10 мкг/мл) эффектов ADCC после предварительного лечения блокатором рецептора Fc с РВМС (соотношение Е : Т = 50 : 1); на **ФИГ. 5Г** показаны уровни IFN- $\gamma$  (пг/мл) в культуральной среде клеток PDC, сокультивированных с клетками РВМС, в присутствии IgG1, амивантамаба или цетуксимаба, определенные посредством ELISA (\*P < 0,0001 по сравнению с цетуксимабом в той же концентрации); на **ФИГ. 5Д** показано, что после предварительного лечения блокатором рецептора Fc клетки РВМС уменьшали уровень IFN- $\gamma$  в культуральной среде в присутствии амивантамаба (10 мкг/мл), \*P < 0,0001, \*\*P < 0,001.

На **ФИГ. 6А–6Г** продемонстрировано снижение опухолей в модели PDX с мутацией EGFR D770\_N771insG с помощью амивантамаба. На **ФИГ. 6А** представлены данные секвенирования по Сэнгеру, иллюстрирующие мутации D770\_N771 insG гена *EGFR* в модели PDX; на **ФИГ. 6Б** показаны средние объемы опухолей, полученных у пациента, имплантированные бестимусным мышам линии BALB/c, получавшим лечение несущей средой, амивантамабом (10 мг/кг) или цетуксимабом (10 мг/кг) два раза в неделю посредством в/б инъекций или позитинибом (1 мг/кг) один раз в два дня (\*P < 0,0001); на **ФИГ. 6В** показаны уровни белка в опухолях, полученных из моделей PDX YHIM-1029, после лечения амивантамабом, 10 мг/кг; на **ФИГ. 6Г** показаны уровни белка в опухолях, полученных из моделей PDX YHIM-1029, после лечения цетуксимабом, 10 мг/кг, или позитинибом, 1 мг/кг.

На **ФИГ. 7** показан план исследования для двухчастного исследования фазы I амивантамаба у пациентов с НМРЛ на поздней стадии (NCT02609776); Когорты А (устойчивость к EGFR-зависимости) и В (устойчивость к EGFR-независимости) были закрыты. 3GTKI = ингибитор тирозинкиназы 3-го поколения; amp = амплификация; C = цикл; ECOG PS = общее состояние по шкале Восточной объединенной онкологической группы; PK = фармакокинетика; RP2D = рекомендованная доза для фазы 2; SOC = стандарт лечения.

На **ФИГ. 8** показано наилучшее процентное изменение от исходного показателя суммы диаметров целевых поражений. \*Неподтвержденный частичный ответ, а — 2 пациента, получившие лечение TKI EGFR, 1 пациент, получивший

лечение бевацизумабом плюс лучевая терапия, 1 пациент, получивший адъювантную иммуноонкологическую химиотерапию. У 2 пациентов отсутствовали оценки заболевания после исходного уровня, и они не были включены в график. SoD = сумма диаметров.

5 На **ФИГ. 9** показан наилучший ответ; а — частичный ответ или более лучший, b — частичный ответ, или более лучший, или стабильное заболевание в течение по меньшей мере 12 недель (2 оценки заболевания). NE = не подлежит оценке; ORR = общая частота ответа; PD = прогрессирующее заболевание; PR = частичный ответ; SD = стабильное заболевание.

10 На **ФИГ. 10** показано изменение от времени суммы целевых диаметров поражения по сравнению с исходным показателем; а — 2 пациента, получившие лечение TKI EGFR, 1 пациент, получивший лечение бевацизумабом плюс лучевая терапия, 1 пациент, получивший адъювантную иммуноонкологическую химиотерапию.

15 На **ФИГ. 11** показана выживаемость без признаков прогрессирования.

На **ФИГ. 12А–12В** показано снижение опухолей у пациентов с НМРЛ с мутациями Exon20ins в *EGFR* после лечения амивантамабом. На **ФИГ. 12А** показан радиологический ответ после лечения амивантамабом, 1050 мг, у пациента в возрасте 58 лет с мутацией H773delinsNPY в *EGFR*; на **ФИГ. 12Б** показан радиологический ответ после лечения амивантамабом, 1050 мг, у пациента в возрасте 48 лет с мутацией S768\_D770dup в *EGFR*; на **ФИГ. 12В** показана предложенная модель различных противоопухолевых механизмов амивантамаба при НМРЛ с Exon20ins в *EGFR*.

## 25 **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **Определения**

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

30 Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в данном документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое

значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

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

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

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

Соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых  
20 элементов следует понимать как включающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов  
25 соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и  
30 «состоящий из» предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) термин «состоящий из» исключает любые

элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения; и (iii) термин «состоящий преимущественно из» ограничивает объем пункта формулы изобретения конкретными материалами или этапами «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основную(-ые) и новую(-ые)

5 характеристику(-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

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

Термин «**выделенный**» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды, полипептидные векторы или вирусы), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%,  
20 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

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

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

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

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

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

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

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

начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

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

Термин **«субъект»** включает любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин **«животное, не относящееся к человеку»** включает всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины **«субъект»** и **«пациент»** в настоящем документе применяются взаимозаменяемо.

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

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

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

Термин **«рецептор эпидермального фактора роста»** или **«EGFR»** относится к человеческому EGFR (также известному как HER1 или ErbB1 (Ullrich *et al*, Nature 309:418–425, 1984) с аминокислотной последовательностью, представленной в каталоге базы генетических данных под номером NP\_005219), а также к их вариантам природного происхождения.

Термин «**мутации экзона 20 в EGFR**», или «**Exon20ins в EGFR**», или «**Exon20ins**» относится к гену EGFR человека, включающему по меньшей мере одну мутацию в нуклеотидах, которые преобразуются в аминокислоты в положении 762–823 и включают в себя С-спираль (762–766), а затем петлю (767–775) (см. Yasuda H et al., Science Translational Medicine 2013; 5(216):216ra177 doi 10.1126/scitranslmed.3007205). Мутации со вставкой от одной до семи аминокислот в экзоне 20 образуют клин в конце С-спирали в EGFR, который промотирует конформацию активной киназы.

Термин «**рецептор фактора роста гепатоцитов**» или «**c-Met**» в настоящем документе относится к c-Met человека с аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа в Genbank: NP\_001120972, и ее природными вариантами.

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

Термины «**специфическое связывание**», или «**специфически связывает**», или «**связывает**» относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, например около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, с  $K_D$ , которая по меньшей мере в сто раз ниже его  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерять с помощью общеизвестных методов. Однако антитела, которые связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например к такому же антигену от других биологических видов (гомологов), например человека или обезьяны, например *Macaca fascicularis* (яванского макака) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое

антитело связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термин «**антитела**» подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, например биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п. антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт 5 10 требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи 15 (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL 20 состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «**определяющие комплементарность области (CDR)**» относится к области антител, которые связывают антиген. CDR можно определять с помощью 25 различных схем, например по Кабат (Wu et al. (1970) *J Exp Med* 132: 211-50) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia *et al.* (1987) *J Mol Biol* 196: 901–17), IMGT (Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55–77) и AbM (Martin and Thornton (1996) *J Mol Biol* 263: 800-15). Описано соответствие между 30 различными схемами и нумерациями переменных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55–77; Honegger and Pluckthun, (2001) *J Mol Biol* 309:657–70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, [http://www\\_imgt\\_org](http://www_imgt_org)). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем

документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное

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

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

Термин «**моноклональное антитело**» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот,

окисление метионина или аспарагина или дезамидирование глутамина.

Моноклональные антитела, как правило, связывают один антигенный эпитоп.

Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин «**рекомбинантный**» относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин «**биспецифический**» относится к антителу, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабоед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

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

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

Термин «**биологическая проба**» относится к сбору аналогичных текущих сред, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также к текущим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри субъекта. Примерами проб являются биологические текущие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные

текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитная жидкость, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из  
5 бронхов, синовиальная текучая среда, жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т. п., биоптаты тканей, биопсии опухолевых тканей, пробы опухолевых тканей, аспираты, взятые тонкой иглой, ткань после хирургической резекции,  
10 культуры органов или культуры клеток.

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

Термин «**нормальнофукозный**» или «с нормальным содержанием фукозы» в настоящем документе относится к антителам с содержанием фукозы более около  
15 50%, как правило, более около 80% или более около 85%.

#### **Способы по описанию**

Амивантамаб или JNJ-61186372 (JNJ-372) представляет собой биспецифическое антитело к EGFR/c-Met IgG1, описанное в патенте США  
20 № 9,593,164.

Данное описание основано по меньшей мере частично на заключении о том, что амивантамаб эффективен при лечении субъектов, имеющих мутацию экзона 20 в EGFR.

Мутации экзона 20 в EGFR содержат мутации со вставкой от одной до семи аминокислот в экзон 20. Экзон 20 в EGFR охватывает нуклеотиды, которые преобразуются в аминокислоту в положении 762–823. Он содержит С-спираль (остатки 762–766) и петлю, следующую за С-спиралью (остатки 767–774), причем вставки могут индуцировать лиганд-независимую активацию пути EGFR и вызывать онкогенез. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет  
25 собой вставку одной аминокислоты в экзон 20. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку двух аминокислот в экзон 20. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку трех аминокислот в экзон 20. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку четырех аминокислот в экзон 20. В  
30

одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку пяти аминокислот в экзон 20. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку шести аминокислот в экзон 20. В одном варианте осуществления мутация экзона 20 в EGFR представляет собой вставку семи аминокислот в экзон 20.

В одном варианте осуществления необычные мутации EGFR содержат мутации S768I, L861Q и/или G719X. В одном варианте осуществления X представляет собой любую аминокислоту, отличную от G. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719A. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719C. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719S. В одном варианте осуществления G719X представляет собой G719D.

Некоторые варианты осуществления настоящего описания относятся к определению того, имеется ли у субъекта одна или более мутаций экзона 20 в EGFR, такие как мутация со вставкой или другие необычные мутации. В данной области известны способы определения мутаций, включая ПЦР с последующим секвенированием нуклеиновых кислот, FISH, CGH или секвенирование нового поколения (NGS). В некоторых вариантах осуществления мутации экзона 20 или другие необычные мутации обнаруживаются секвенированием ДНК, например секвенированием нового поколения (NGS), с использованием пробы опухолевой ткани или свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы.

В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, имеющему рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего мелкоклеточный рак легкого (SCLC), который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, с биспецифическим антителом к EGFR/c-Met, включающий: получение биологической пробы субъекта; определение наличия или отсутствия мутации экзона 20 в EGFR в пробе; введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, который, как определено, имеет мутацию экзона 20 в EGFR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биологическая проба представляет собой пробу крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биологическая проба представляет собой биоптат опухолевого образования.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывается с EGFR, и второй домен, который специфически связывается с c-Met, причем первый домен содержит определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую

комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

5 В одном варианте осуществления первый домен, который специфически связывается с EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 13 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14; и второй домен, который специфически связывается с c-Met, содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

10 В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1.

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

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит биантенарную структуру гликанов с содержанием фукозы в диапазоне от около 1% до около 15%.

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

Xhou *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 99:652–65, 2008). В целом снижение содержания фукозы в гликанах антител усиливает клеточную цитотоксичность, опосредованную антителами (ADCC).

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который

специфически связывает с-Met, при этом первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, имеющему SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает с-Met, при этом первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, имеющему аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает с-Met, при этом первый домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, LCDR1 с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6; а второй домен содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

30

В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, имеющему рак, который

является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO:

13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1 и содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1 и содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего НМРЛ, который является положительным в отношении мутации

экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1 и содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1 и содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met представляет собой изотип IgG1 и содержит первый домен, который специфически связывает EGFR, и второй домен, который специфически связывает c-Met, при этом первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 13 и VL с SEQ ID NO: 14; а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.

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

может относиться к любому аллотипу IgG1, например G1m17, G1m3, G1m1, G1m2, G1m27 или G1m28.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 с SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему рак легкого, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 с SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему НМРЛ, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 с SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему SCLC, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 с SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

В настоящем описании также предложен способ лечения субъекта, имеющего аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к EGFR/c-Met субъекту, имеющему аденокарциному легкого, которая является положительной в отношении мутации экзона 20 в EGFR, причем биспецифическое антитело к EGFR/c-Met содержит HC1 с SEQ ID NO: 17, LC1 с SEQ ID NO: 18, HC2 с SEQ ID NO: 19 и LC2 с SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдается рецидив или резистентность к лечению одной или более предшествующими противораковыми терапиями.

В некоторых вариантах осуществления субъект приобрел мутацию экзона 20 в EGFR в результате лечения одной или более предшествующими противораковыми терапиями.

В некоторых вариантах осуществления субъект приобрел мутацию экзона 20 в EGFR в результате лечения ингибитором киназы.

В некоторых вариантах осуществления субъект приобрел мутацию экзона 20 в EGFR в результате лечения ингибитором киназы в EGFR.

В некоторых вариантах осуществления субъект приобрел мутацию экзона 20 в EGFR в результате лечения ингибитором киназы в c-Met.

В некоторых вариантах осуществления одна или более предшествующих противораковых терапий включают один или более химиотерапевтических препаратов, ингибиторов контрольной точки, нацеленные противораковые терапии или ингибиторы киназы или любую их комбинацию.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefitinиб, lapatinиб, vandetanиб, afatinиб, osimertиниб, лазертиниб, poziотиниб, криотитиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.

В некоторых вариантах осуществления одна или более предшествующих противораковых терапий включают карбоплатин, паклитаксел, гемцитабин,

цисплатин, винорелбин, доцетаксел, пальбоциклиб, кризотиниб, ингибитор оси PD-(L)1, ингибитор EGFR, ингибитор c-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR, ингибитор AXL, эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позиотиниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб или любую их комбинацию.

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

Для определения того, имеет ли субъект резистентность, приобретенную резистентность или предрасположенность к приобретению резистентности к противораковой терапии, можно использовать различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью к противораковой терапии, включают ухудшение или отсутствие улучшения состояния здоровья пациента, увеличение размера опухоли, прекращение или замедление торможения роста опухоли и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Показателем того, что у субъекта развилась резистентность или имеется предрасположенность к развитию резистентности к противораковой терапии, также может быть повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных

с раком, таких как анорексия, когнитивные расстройства, депрессия, диспноэ, утомляемость, гормональные нарушения, нейтропения, боль, периферическая нейропатия и половая дисфункция. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьироваться в зависимости от типа ракового заболевания. Например, 5 симптомы, связанные с раком шейки матки, могут включать аномальное кровотечение, атипичные обильные влагалищные выделения, тазовую боль, не связанную с нормальным менструальным циклом, боль в мочевом пузыре или боль при мочеиспускании, кровотечение в период между регулярными менструальными периодами, боль после полового акта, вагинального душа или обследования 10 тазовых органов. Симптомы, связанные с раком легких, могут включать устойчивый кашель, откашливание крови, нехватку дыхания, дыхание с присвистом и болью в груди, потерю аппетита, ненамеренную потерю массы тела и утомляемость. Симптомы рака печени могут включать потерю аппетита и веса, боль в животе, особенно в верхней правой части живота, которая может отдавать в 15 спину и плечо, тошноту и рвоту, общую слабость и утомляемость, увеличение печени, вздутие живота (асцит) и желтую окраску кожи и белков глаз (желтуха). Специалист-онколог может легко идентифицировать симптомы, связанные с конкретным типом рака.

Примерами ингибиторов оси PD-(L)1 являются антитела, связывающиеся с 20 PD-1, такие как ниволумаб (OPDIVO<sup>®</sup>), пембролизумаб (KEYTRUDA<sup>®</sup>), синтилимаб, цемипликамаб (LIVTAYO<sup>®</sup>), триполимаб, тиснолизумаб, спартализумаб, камрелизумаб, достралимаб, генолимзумаб или цетрелимаб, или антитела, связывающиеся с PD-L1, такие как антитела к PD-L1, например, энвафолимаб, атезолизумаб (TECENTRIQ<sup>®</sup>), дурвалумаб (IMFINZI<sup>®</sup>) и авелумаб (BAVENCIO<sup>®</sup>).

25 Антитела можно приобрести через уполномоченного дистрибьютора или аптеки. Структуры аминокислотных последовательностей малых молекул можно найти в документах USAN и/или INN из реестра CAS.

В некоторых вариантах осуществления субъект ранее не получал лечение.

В некоторых вариантах осуществления мутация экзона 20 в EGFR 30 представляет собой мутацию *de novo*.

Активирующие EGFR мутации, которые могут быть связаны с раком, включают точечные мутации, делеционные мутации, вставочные мутации, инверсии или амплификации генов, которые приводят к увеличению по меньшей мере одной биологической активности EGFR, такой как повышенная

тирозинкиназная активность, образование гомодимеров и гетеродимеров рецепторов, усиленное связывание с лигандом и т. д. Мутации могут быть локализованы в любой части гена EGFR или регуляторной области, связанной с геном EGFR, и включать мутации в экзоне 18, 19, 20 или 21 или мутации в киназном домене. Другие примеры активирующих EGFR мутаций известны в

данной области (см. патентную публикацию США № US2005/0272083). Информация о EGFR и других рецепторах ErbB, включая гомо- и гетеродимеры рецепторов, лиганды рецепторов, сайты аутофосфорилирования и сигнальные молекулы, участвующие в опосредованной ErbB передаче сигналов, известна в

данной области (см. Hynes и Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341–354, 2005). В некоторых вариантах осуществления активирующая EGFR мутация содержит замену L718Q, G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, C797S, L858P или T790M, делецию E746–A750, делецию R748–P753, вставку Ala (A) между M766 и A767, вставку Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769, вставку Asn и Ser (NS) между P772 и H773, вставку одной или более аминокислот между D761 и E762, A763 и Y764, Y764 и Y765, M766 и A767, A767 и V768, S768 и V769, V769 и D770, D770 и N771, N771 и P772, P772 и H773, H773 и V774, V774 и C775, одну или более делеций в экзоне 20 в EGFR или любую их комбинацию.

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

В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает в себя рак легкого, рак желудка, колоректальный рак, рак головного мозга, рак,

происходящий из эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC), или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает эпителиально-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак яичника. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак анального канала. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак

глотки. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак носа. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак кожи. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак ротовой полости. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак языка. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает вагинальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак яичка. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак тимуса. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает рак печени. В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает гепатоцеллюлярную карциному (HCC). В некоторых вариантах осуществления рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включает спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC).

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления субъект дополнительно получает одну или более противораковых терапий.

В некоторых вариантах осуществления одна или более противораковых терапий включают в себя химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, нацеленную противораковую терапию или ингибитор киназы или любую их комбинацию.

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



осуществления ингибитор киназы представляет собой сорафениб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой сунитиниб.

Противораковые терапии, которые можно использовать в комбинации с биспецифическим антителом к EGFR/c-Met в способах настоящего описания, включают в себя любое одно или более из химиотерапевтических лекарственных препаратов или других противораковых терапевтических агентов, известных специалистам в данной области. Химиотерапевтические препараты представляют собой химические соединения, используемые в лечении рака, и включают ингибиторы роста или другие цитотоксические агенты, и включают алкилирующие средства, антиметаболические средства, ингибиторы микротрубочек, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ингибиторы роста сосудов и т. п. Примеры химиотерапевтических препаратов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамидина оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуromoцин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиандрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан,

тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; добавки для восполнения дефицита фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминолевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен;

5 эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиковон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиковон; 2,2',2''-

10 трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ага-С); циклофосфамид; тиотепа; представители семейства таксоидов или таксанов, такие как паклитаксел (ТАКСОЛ®) доцетаксел (ТАКСОТЕР®) и их аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С;

15 митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДФМО); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и/или ангиогенеза, включая сорафениб (NEXAVAR®), сунитиниб (SUTENT®), пазопаниб (VOTRIENT™), тоцераниб (PALLADIA™), вандетиниб (ZACTIMA™), цедираниб (RECENTIN®), регорафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестауртиниб (CEP-701), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA®), афатиниб (BIBW 2992), лапатиниб (TYKERB®), нератиниб (HKI-272) и т. п. и

25 фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых указанных выше соединений. Кроме того, данное определение включает антигормональные агенты, действие которых направлено на регуляцию или ингибирование действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-

30 гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленного выше. Другие традиционные химические соединения цитотоксического действия, описанные в Wiemann et al., 1985, в

*Medical Oncology* (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

## **Введение**

5           Биспецифическое антитело к EGFR/c-Met может быть введено в фармацевтически приемлемый носитель. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело по изобретению. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или  
10           синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, для получения биспецифического антитела к EGFR/c-Met можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% глицин. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик  
15           стерилизации (например, фильтрации). Для парентерального введения носитель, как правило, состоит из стерильной воды, а для улучшения растворимости или консервации можно добавлять другие вспомогательные вещества. Суспензии или растворы для введения путем инъекции можно также получать с использованием водных носителей вместе с соответствующими добавками. Приемлемые несущие  
20           среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams и Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691–1092, в особенности см. стр. 958–989.

25           Способом введения может быть любой приемлемый путь доставки биспецифического антитела к EGFR-c-Met субъекту, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, легочное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное введение) с использованием такой  
30           лекарственной формы, как таблетки, капсулы, растворы, порошки, гели, гранулы; и введение антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством

доставки в опухоль, сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе от около 140 мг до около 1750 мг. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе от около 140 мг до около 1750 мг.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 200 мг, около 210 мг, около 220 мг, около 230 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 260 мг, около 270 мг, около 280 мг, около 290 мг, около 300 мг, около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг, около 460 мг, около 470 мг, около 480 мг, около 490 мг, около 500 мг, около 510 мг, около 520 мг, около 530 мг, около 540 мг, около 550 мг, около 560 мг, около 570 мг, около 580 мг, около 590 мг, около 600 мг, около 610 мг, около 620 мг, около 630 мг, около 640 мг, около 650 мг, около 660 мг, около 670 мг, около 680 мг, около 690 мг, около 700 мг, около 710 мг, около 720 мг, около 730 мг, около 740 мг, около 750 мг, около 760 мг, около 770 мг, около 780 мг, около 790 мг, около 800 мг, около 810 мг, около 820 мг, около 830 мг, около 840 мг, около 850 мг, около 860 мг, около 870 мг, около 880 мг, около 890 мг, около 900 мг, около 910 мг, около 920 мг, около 930 мг, около 940 мг, около 950 мг, около 960 мг, около 970 мг, около 980 мг, около 990 мг, около 1000 мг, около 1010 мг, около 1020 мг, около 1030 мг, около 1040 мг, около 1050 мг, около 1060 мг, около 1070 мг, около 1080 мг, около 1090 мг, около 1100 мг, около 1110 мг, около 1120 мг, около 1130 мг, около 1140 мг, около 1150 мг, около 1160 мг, около 1170 мг, около 1180 мг, около 1190 мг, около 1200 мг, около 1210 мг, около 1220 мг, около 1230 мг, около 1240 мг, около 1250 мг, около 1260 мг, около 1270 мг, около 1280 мг, около 1290 мг, около 1300 мг, около 1310 мг, около 1320 мг, около 1330 мг, около 1340 мг, около 1350 мг, около 1360 мг, около 1370 мг, около 1380 мг, около 1390 мг, около 1400 мг, около 1410 мг, около 1420 мг, около 1430 мг, около 1440 мг, около 1450 мг, около

1460 мг, около 1470 мг, около 1480 мг, около 1490 мг, около 1500 мг, около  
1510 мг, около 1520 мг, около 1530 мг, около 1540 мг, около 1550 мг, около  
1560 мг, около 1570 мг, около 1580 мг, около 1590 мг, около 1600 мг, около  
1610 мг, 1620 мг, около 1630 мг, около 1640 мг, около 1650 мг, около 1660 мг,  
5 около 1670 мг, около 1680 мг, около 1690 мг, около 1700 мг, около 1710 мг, около  
1720 мг, около 1730 мг, около 1740 мг, около 1750 мг, около 1760 мг, около  
1770 мг, около 1780 мг, около 1790 мг, около 1800 мг, около 1810 мг, около  
1820 мг, около 1830 мг, около 1840 мг, около 1850 мг, около 1860 мг, около  
1870 мг, около 1880 мг, 1890 мг, около 1900 мг, около 1910 мг, около 1920 мг,  
10 около 1930 мг, около 1940 мг, около 1950 мг, около 1960 мг, около 1970 мг, около  
1980 мг, около 1990 мг или около 2000 мг.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к  
EGFR/c-Met вводят в дозе около 350 мг, около 700 мг, около 1050 мг или около  
1400 мг. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к  
15 EGFR/c-Met вводят в дозе около 350 мг. В некоторых вариантах осуществления  
биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 700 мг. В некоторых  
вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе  
около 750 мг. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к  
EGFR/c-Met вводят в дозе около 800 мг. В некоторых вариантах осуществления  
20 биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 850 мг. В некоторых  
вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе  
около 900 мг. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к  
EGFR/c-Met вводят в дозе около 950 мг. В некоторых вариантах осуществления  
биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1000 мг. В  
25 некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met  
вводят в дозе около 1050 мг. В некоторых вариантах осуществления  
биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1100 мг. В  
некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met  
вводят в дозе около 1150 мг. В некоторых вариантах осуществления  
30 биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1200 мг. В  
некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met  
вводят в дозе около 1250 мг. В некоторых вариантах осуществления  
биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1300 мг. В  
некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met

вводят в дозе около 1350 мг. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1400 мг.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1050 мг один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1400 мг раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1050 мг раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 1400 мг раз в две недели.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят раз в четыре недели.

В отношении комбинированных терапий один или более противораковых средств можно вводить с помощью рекомендуемых доз и дозировок противоракового средства.

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

Примером биспецифического антитела к EGFR/c-Met, которое можно применять в способах описания, является амивантамаб. Амивантамаб характеризуется следующими аминокислотными последовательностями:

30 Плечо, связывающееся с EGFR  
> SEQ ID NO: 1 (HCDR1; плечо, связывающееся с EGFR)  
TYGMH

> SEQ ID NO: 2 (HCDR2; плечо, связывающееся с EGFR)  
35 VIWDDGSYKYYGDSVKG

- > SEQ ID NO: 3 (HCDR3; плечо, связывающееся с EGFR)  
DGITMVRGVMKDYFDY
- 5 > SEQ ID NO: 4 (LCDR1; плечо, связывающееся с EGFR)  
RASQDISSALV
- > SEQ ID NO: 5 (LCDR2; плечо, связывающееся с EGFR)  
DASSLES
- 10 > SEQ ID NO: 6 (LCDR3; плечо, связывающееся с EGFR)  
QQFNSYPLT
- > SEQ ID NO: 7 (HCDR1; плечо, связывающееся с c-Met)  
SYGIS
- 15 > SEQ ID NO: 8 (HCDR2; плечо, связывающееся с c-Met)  
WISAYNGYTNYAQKLQG
- > SEQ ID NO: 9 (HCDR3; плечо, связывающееся с c-Met)  
20 DLRGTNYFDY
- > SEQ ID NO: 10 (LCDR1; плечо, связывающееся с c-Met)  
RASQGISNWL A
- 25 > SEQ ID NO: 11 (LCDR2; плечо, связывающееся с c-Met)  
AASSLLS
- > SEQ ID NO: 12 (LCDR3; плечо, связывающееся с c-Met)  
QQANSFPIT
- 30 > SEQ ID NO: 13 (VH; плечо, связывающееся с EGFR)  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDD  
GSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVM  
KDYFDYWGQGTLVTVSS
- 35 > SEQ ID NO: 14 (VL; плечо, связывающееся с EGFR)  
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV  
PSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
- 40 > SEQ ID NO: 15 (VH; плечо, связывающееся с c-Met)  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYGISWVRQAPGHGLEWWMGWISAY  
NGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDY  
WGQGTLVTVSS
- 45 > SEQ ID NO: 16 (VL; плечо, связывающееся с c-Met)  
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSG  
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
- > SEQ ID NO: 17 HC1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW  
 DDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVR  
 GVMKDYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
 5 SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

> SEQ ID NO: 18 LC1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES  
 GVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 15 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 19 HC2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYGISWVRQAPGHGLEWMGWISA  
 YNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYF  
 20 DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK  
 RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
 KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 25 AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 20 LC2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLL  
 30 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35

Другие общедоступные биспецифические антитела к EGFR/c-Met также могут  
 быть применены в способах по настоящему описанию, если они демонстрируют  
 аналогичные характеристики по сравнению с амивантамабом, как описано в патенте  
 США № 9,593,164. Биспецифические антитела к EGFR/c-Met, которые могут быть  
 применены в способах по настоящему описанию, также могут быть получены путем  
 объединения общедоступных доменов VH/VL, связывающих EGFR, и доменов  
 40 VH/VL, связывающих c-Met, и испытания полученных биспецифических антител в  
 отношении их характеристик, как описано в патенте США № 9 593 164.

Биспецифические антитела к EGFR/c-Met, используемые в способах  
 настоящего описания, можно получить, например, путем обмена Fab-плечами (или  
 обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными

антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов.

Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации - ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т. е. эпитопом на EGFR и эпитопом на c-Met.

Например, биспецифические антитела по изобретению могут быть получены с использованием технологии, описанной в международных патентных публикациях № WO2011/131746. В случае антител IgG1 можно применять мутации F405L в одной тяжелой цепи и K409R в другой тяжелой цепи. Для антител IgG2 можно применять IgG2 дикого типа и антитело IgG2 с заменами F405L и R409K. Для антител IgG4 можно применять IgG4 дикого типа и антитело IgG4 с заменами F405L и R409K. Для создания биспецифических антител конструируют первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело так, чтобы в области Fc они имели вышеупомянутую мутацию; антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирных областях могли подвергаться изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена Fab-плечами. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в

присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне рН 5–8, например при рН = 7,0 или при рН = 7,4.

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

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию No. WO 2006/028936) выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СН3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СН3, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СН3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СН3 первой тяжелой цепи / модифицированное положение во втором домене СН3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

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

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению могут применяться другие стратегии перенаправления посредством обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или внутри тяжелой цепи в биспецифических антителах (либо в

одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, CH3 с CL и CH3 с CH1, как описано в патентных публикациях № WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 и WO2009/080252.

5           Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133;  
10           патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать посредством следующих замен (указаны модифицированные положения в первом CH3-домене первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором CH3-домене второй  
15           тяжелой цепи): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F или T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США  
20           № US2013/0195849.

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

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

## Иллюстративные варианты осуществления

- 1) Способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.
- 2) Способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении этой мутации.
- 3) Способ лечения субъекта, имеющего рак, с биспецифическим антителом к EGFR/с-Met, включающий:
  - а) получение биологической пробы субъекта;
  - б) определение наличия или отсутствия мутации экзона 20 в EGFR в пробе; и
  - с) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет мутацию экзона 20 в EGFR.
- 4) Способ лечения субъекта, имеющего рак, с биспецифическим антителом к EGFR/с-Met, включающий:
  - а) получение биологической пробы субъекта;
  - б) определение наличия или отсутствия мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X в пробе; и
  - с) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет указанную мутацию.
- 5) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первый домен, который специфически связывается с EGFR, и второй домен, который специфически связывается с с-Met, причем первый домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, и при этом второй домен, который связывается с с-Met,

содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.

- 5 б) Способ по варианту осуществления 5, в котором первый домен, который специфически связывается с EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 13 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14, а второй домен, специфически связывающийся с с-Met, содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.
- 10 7) Способ по варианту осуществления 1, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met представляет собой изотип IgG1.
- 8) Способ по варианту осуществления 1, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 17, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 19 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 20.
- 15 9) Способ по любому одному варианту осуществления 1, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит биантенарную структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%.
- 10) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором у субъекта наблюдается рецидив или резистентность к лечению одним или более предшествующими противораковыми терапиями.
- 20 11) Способ по варианту осуществления 10, в котором одна или более предшествующих противораковых терапий содержат один или более химиотерапевтических препаратов, ингибиторов контрольной точки, нацеленные противораковые терапии, или ингибиторы киназы, или любую их комбинацию.
- 25 12) Способ по варианту осуществления 10, в котором одна или более предшествующих противораковых терапий содержат карбоплатин, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, винорелбин, доцетаксел, пальбоциклиб, кризотиниб, ингибитор оси PD-(L)1, ингибитор EGFR, ингибитор с-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR, ингибитор AXL, ингибитор эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позиотиниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб, или сунитиниб, или любую их комбинацию.
- 30

- 13) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором субъект ранее не получал лечение.
- 14) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором рак представляет собой рак легкого, рак желудка, колоректальный рак, рак головного мозга, рак, происходящий из эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC), или любую их комбинацию.
- 15) Способ по варианту осуществления 14, в котором рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или аденокарциному легкого, легочную саркоматоидную карциному или любую их комбинацию.
- 16) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, включающий дополнительное получение субъектом одной или более противораковых терапий.
- 17) Способ по варианту осуществления 16, в котором одна или более противораковых терапий представляют собой химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, нацеленную противораковую терапию, ингибитор киназы или любую их комбинацию.
- 18) Способ по варианту осуществления 17, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, ингибитор c-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR или ингибитор AXL.
- 19) Способ по варианту осуществления 18, в котором ингибитор киназы представляет собой эрлотиниб, gefitinиб, lapatinиб, vandetanиб, afatinиб, osimertиниб, лазертиниб, poziотиниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.
- 20) Способ по любому из вариантов осуществления 1 или 3, в котором мутация экзона 20 в EGFR представляет собой мутацию *de novo*.

- 21) Способ по любому из вариантов осуществления 1 или 3, в котором мутация экзона 20 в EGFR представляет собой приобретенную мутацию.
- 22) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе от около 140 мг до  
5 около 1750 мг.
- 23) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе около 700 мг, около 750 мг, около 800 мг, около 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг или 1400 мг.
- 10 24) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе 1050 мг.
- 25) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят в дозе 1400 мг.
- 15 26) Способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/c-Met вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

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

## Пример 1. Материалы и способы

### **Линии клеток Ва/Ф3 и лекарственные соединения**

Все мутантные линии клеток Ва/Ф3 были приобретены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур и получены из Института раковых исследований Dana-Farber, Гарвардский университет, США. Все клетки выдерживали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и пуромицина в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Контрольные группы амивантамаба и IgG1 были предоставлены компанией Janssen. Гефитиниб, осимертиниб, цетуксимаб и позиотиниб были приобретены в компании SellkChem (г. Хьюстон, штат Техас, США).

### **Антитела**

Первичные антитела, специфичные к p-EGFR (2234), EGFR (4267), p-cMet (3077), cMet (8198), p-ERK (4370), ERK (9107), p-AKT (9271), AKT (9272), p-S6 (4858), S6 (2217), p27 (2252), расщепленный PARP (5625S), расщепленная каспаза 3 (9661) и BIM (2933) были приобретены в компании Cell Signaling Technologies; p21 (sc-817) и p53 (sc-126) были приобретены в компании Santa Cruz Biotechnology, Inc., GAPDH (PAB13195) был приобретен в компании Abnova (Тайбэй, Тайвань). Для ИHC-анализа mF4/80 (#70076) и mNKp46 (AF2225) были приобретены в компаниях Cell Signaling Technologies и R&D systems соответственно.

### **Полученные у пациента клетки**

Линии клеток YU-1163 (S768\_D770dup) получали из злокачественных выпотов от пациентов с НМРЛ и культивировали на покрытых коллагеном планшетах в среде ACL-4 с добавлением 5% FBS. Клетки поддерживали драйверный онкоген, который наблюдался у пациентов. Клетки обогащали в популяции клеток, положительных в отношении адгезивных молекул эпителиальных клеток (EpCAM), с чистотой более 95%, после чего они были подвергнуты дополнительным анализам. Линии клеток DFCI-58 (H773\_V774insNPH) и DFCI-127 (P772\_H773insPNP) получали из Института раковых исследований Dana-Farber, Гарвардский университет, США, и культивировали в среде ACL-4 и среде RPMI с 10% FBS соответственно. Все пробы пациента были отобраны после получения письменного информированного согласия пациента. Протоколы исследования были одобрены соответствующими экспертными советами учреждения.

### **Полученная у пациента органоподобная культура**

Полученные у пациента органоиды (YUO-029 и YUO-036) были сформированы, как описано ранее (54). Вкратце, злокачественные выпоты от двух пациентов с НМРЛ отбирали, центрифугировали, а клеточные осадки смешивали со средой Matrigel с пониженным содержанием факторов роста (Corning) и высевали в 48-луночные планшеты. На затвердевшие гели наносили улучшенную среду DMEM/F12 (Invitrogen), содержащую 1X Glutamax (Invitrogen), 10 мМ HEPES (Invitrogen), 1X антибиотик-антимикотик (Invitrogen), 1X B-27 (Invitrogen), 20% кондиционированной среды R-спондина, 5 мМ никотинамида (Sigma), 1,25 мМ N-ацетилцистеина (Sigma), 500 нМ SB-202190 (Sigma), 500 нМ A83-01 (Tocris), 100 нг/мл ноггина мыши (Peprotech), 100 нг/мл FGF10 человека (Peprotech), 25 нг/мл FGF7 человека (Peprotech), 50 мкг/мл примоцина (Invivogen) и 10 мкМ Y-27632 (Enzo). Среда, кондиционированная R-спондином, была получена из клеток HA-R-Spondin1-Fc 293T (Amsio, Abingdon, Великобритания). Для пассирования органоиды отбирали, механически разрезали иглой 25-го калибра и промывали холодным PBS, после чего пеллеты органоидов ресуспендировали в среде Matrigel и высевали в 24-луночные планшеты в соотношении от 1 : 2 до 1 : 4. Культуральную среду пополняли по меньшей мере два раза в неделю. Испытание жизнеспособности клеток проводили, как описано ранее (55). Вкратце, органоиды трипсинизировали в отдельные клетки и культивировали в течение 5–10 суток. Затем органоиды отбирали, ресуспендировали в среде, содержащей 5% Matrigel, и высевали в 96-луночный планшет (Corning) в концентрации 2000 органоидов/мкл. Среда с контрольным IgG1 или амивантамабом в различных концентрациях добавляли и инкубировали в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием реагента для культивирования CellTiter-Glo 3D (Promega) на микропланшетном люминометре в соответствии с инструкциями производителя.

#### **Модели на основе полученного от пациента ксенотрансплантата**

PDX были созданы с использованием самок мышей в возрасте 6–8 недель с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOG) и бестимусных (nu/nu) мышей, полученных от компании OrientBio (Сеул, Корея). Все методики соответствовали рекомендациям нашего Институционального комитета по исследованиям животных (Медицинский колледж Университета Йонсей) и были одобрены Ассоциацией по оценке и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC). После удаления некротизированных и поддерживающих тканей из образцов толстоигольной биопсии небольшие образцы опухолевой ткани

(3 мм × 3 мм × 3 мм) от каждого пациента подкожно имплантировали 1–2 мышам. После того, как диаметр опухоли достигал 1,5 см, ее вырезали, разделяли на небольшие образцы (3 мм × 3 мм × 3 мм) и реимплантировали бестимусным мышам.

## 5 **Исследования ксенотрансплантата *in vivo***

Самки бестимусных мышей BALB-c/nu в возрасте 5–6 недель были получены от компании Orient Bio. Со всеми мышами обращались в соответствии с рекомендациями Комитета по исследованиям животных при Медицинском колледже Университета Йонсей, и все испытательные лаборатории были одобрены AAALAC. Клетки Ва/F3 и PDC ( $1 \times 10^7$  клеток) вводили подкожно мышам NOG и BALB-c/nu соответственно и измеряли их рост дважды в неделю; после установления пальпируемых повреждений мышам назначали испытания. Когда объем опухоли достигал примерно 150–200 мм<sup>3</sup>, мышей случайным образом распределяли на группы по пять животных для получения одного из несущей среды, контрольного IgG1 или амивантамаба. Размер опухоли измеряли каждые 2 дня с использованием штангенциркуля. Средний объем опухоли в каждой группе, выраженный в мм<sup>3</sup>, рассчитывали по формуле для вытянутого сфероида: объем опухоли =  $0,523 \times (\text{большой диаметр}) \times (\text{малый диаметр})^2$ .

### **Антипролиферативный анализ**

Клетки Ва/F3 или PDC, экспрессирующие мутации Exon20ins в *EGFR*, высевали на 96-луночные планшеты по 100 мкл. После обработки контрольным IgG1, амивантамабом, гефитинибом или осимертинибом в течение 72 часов измеряли жизнеспособность клеток путем количественного определения общего количества АТФ с использованием набора для анализа CellTiter-Glo® 2.0 (Promega) в соответствии с инструкциями производителя.

### **Анализ колониеобразования**

Клетки высевали на 6-луночные культуральные планшеты и инкубировали в течение 12 суток при температуре 37 °С с амивантамабом (0, 0,1 или 1 мг/мл). Клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали и окрашивали 4%-м раствором параформальдегида в 5%-м растворе кристаллического фиолетового в течение 10 мин. Колонии элюировали 1%-м раствором додецилсульфата натрия и определяли значение оптической плотности с помощью ELISA при длине волны 470 нм.

### **Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)**

Анализ ADCC проводили с использованием набора для обнаружения цитотоксичности лактатдегидрогеназы (LDH) (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве эффекторных клеток использовали клетки РВМС человека, полученные от здоровых добровольцев. ADCC проводили с использованием отношения эффекторные клетки : клетки-мишени (Е : Т) в диапазоне от 50 : 1 до 5 : 1 и инкубировали от 4 до 24 часов при температуре 37 °С в среде с 5% CO<sub>2</sub>. Тестировали концентрации амивантамаба от 100 мкг/мл до 0,01 мкг/мл. Измеряли лактатдегидрогеназную активность супернатантов клеточной культуры и рассчитывали процент цитотоксичности, как описано в протоколе производителя.

### **Иммунофлуоресцентный анализ**

PDC высевали на покровные стекла, покрытые 0,01% поли-L-лизина (Sigma-Aldrich). На следующий день клетки обрабатывали контрольным IgG1 или амивантамабом в концентрации 0,1 мг/мл. Через 72 часа покровные стекла фиксировали в 4%-м растворе формальдегида в течение 15 минут, пропитывали 0,5%-м раствором Triton X-100 в течение 5 минут и инкубировали с первичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. Первичные антитела, использованные в исследовании, представляли собой кроличьи моноклональные антитела к EGFR и к cMet (Santa Cruz Biotechnology) и ab992 (Millipore) в разведении 1 : 100. Покровные стекла дважды промывали PBS с последующей инкубацией с соответствующим вторичным антителом, конъюгированным с флуорофором (Invitrogen), в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки контрокрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; 300 нмоль/л; Invitrogen), а покровные стекла устанавливали на предметные стекла с использованием водной монтирующей среды (DAKO) от компании Faramount.

### **Иммуногистохимический анализ**

Иммуногистохимический анализ проводили с использованием автоматизированной системы окрашивания (BOND Rx, Leica Biosystems). Вкратце, срезы опухоли толщиной 4 мм, залитые парафином, депарафинизировали и регидратировали. Затем предметные стекла подвергали термическому восстановлению эпитопов с применением цитратного буфера при температуре 100 °С в течение 20 мин. Антитела использовали при разведении 1 : 100, а для контрокрашивания использовали раствор гематоксилина. Окрашенные предметные

стекла визуализировали с помощью системы Vectra Polaris и программы Phenochart.

### **Фармакодинамическое исследование *in vivo***

5 Мышей-носителей опухолевых тканей обрабатывали несущей средой, контрольным IgG1 или амивантамабом (10 или 30 мг/кг) два раза в неделю внутрибрюшинно (в/б) или цетуксимабом (10 мг/кг), позитинибом (1 мг/кг) один раз в день. Пробы опухолей отбирали через 48 часов после 15 дней лечения и оценивали сигнализацию EGFR и cMet на нижерасположенных участках посредством иммуноблоттинга.

### 10 **Статистический анализ**

Данные отбирали из трех независимых экспериментов и либо представляли описательно, либо анализировали посредством однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия Даннета или t-критерия Стьюдента. Кривые доза-ответ были построены с помощью приложения GraphPad Prism (вер. 5, GraphPad Software Inc.).

15

Пример 2. Амивантамаб ингибирует пролиферацию клеток Ва/Ф3, несущих различные мутации Exon20ins в *EGFR*

Чтобы продемонстрировать противоопухолевую активность амивантамаба в контексте Exon20ins, в клетках Ва/Ф3 стабильно экспрессировали множественные Exon20ins. Было введено пять различных Exon20ins (Фиг. 1Б), все из которых наблюдались у пациентов с НМПЛ (V769\_D770insASV, D770delinsGY, H773\_V774insH, Y764\_V765insHH и D770\_N771insSVD) (20, 21). В клетках Ва/Ф3, обработанных амивантамабом в диапазоне концентраций от 0,05 до 1 мг/мл, наблюдалось значительное и зависимое от дозы снижение жизнеспособности клеток Ва/Ф3 ( $P < 0,0001$ ) во всех пяти мутациях Exon20ins в *EGFR* (Фиг. 1В). Напротив, лечение необратимыми *EGFR*-ТКИ первого и третьего поколения, гефитинибом и осимертинибом соответственно показало ограниченную антипролиферативную активность по сравнению с амивантамабом (Фиг. 1В), что подтверждает хорошо известную резистивность Exon20ins к *EGFR*-ТКИ. При использовании контрольных антител IgG1 в тех же клеточных линиях Ва/Ф3 никакого влияния на жизнеспособность клеток не наблюдалось (данные не показаны). В моделях опухолей, вызванных чувствительными к ТКИ мутациями *EGFR*, такими как L858R или делеции Exon 19, амивантамаб имеет несколько предполагаемых механизмов действия (МОА), включая блокирование связывания лиганда, снижение модуляции рецепторов, ингибирование сигнализации на нижерасположенных участках и запуск иммунонаправленной противоопухолевой активности (22). Чтобы определить, наблюдаются ли эти МОА также в контексте Exon20ins и вносят ли вклад в наблюдаемую антипролиферативную активность, как показано на Фиг. 1В, был проведен иммуноблот-анализ в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих мутации D770delinsGY и H773\_V774insH *EGFR* Exon20ins. После обработки амивантамабом общие уровни *EGFR* были более низкими по сравнению с необработанными клетками (Фиг. 1Г) или клетками, обработанными контрольным антителом IgG1 (данные не показаны). Согласованно со снижением уровней экспрессии *EGFR*, нисходящие сигнальные пути *EGFR* фосфо-*EGFR* (p-*EGFR*), фосфо-АКТ (p-АКТ), фосфо-ERK (p-ERK) и фосфо-S6 (p-S6) также были значительно снижены после лечения амивантамабом (Фиг. 1Г), что свидетельствует о том, что амивантамаб нацелен на *EGFR* и ингибирует связанные с *EGFR* нисходящие сигнальные каскады. Аналогичные результаты наблюдались в клетках Ва/Ф3, экспрессирующих мутации Exon20ins V769insASV, Y764 insHH и

D770\_N771insSVD (данные не показаны). Несмотря на то, что гефитиниб и осимертиниб в количестве 100 нМ способствовали уменьшению p-EGFR в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY и H773\_V774insH, компоненты нисходящего сигнального пути EGFR не ингибировались, что коррелировало с  
5 отсутствием влияния TKI на жизнеспособность клеток (Фиг. 1Д). В недавно проведенных исследованиях poziotinиб продемонстрировал противоопухолевую активность в отношении НМРЛ с Exon20ins в EGFR (23, 24). Далее авторы изобретения оценили тест жизнеспособности клеток для poziotinиба в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих Exon20ins в EGFR (данные не показаны). В  
10 подтверждение предыдущему отчету (23), poziotinиб сильно ингибировал жизнеспособность клеток в клетках с мутациями Exon20ins в EGFR ( $IC_{50}$  в диапазоне от 0,8 до 10,9 нМ). Как сообщалось в предыдущем исследовании (25), poziotinиб также эффективно подавляет пролиферацию клеток Ва/Ф3, содержащих WT EGFR ( $IC_{50} = 0,8$  нМ). Чтобы более сбалансированно представить  
15 селективность в отношении мутации Exon20ins, мы сравнили антипролиферативную активность амивантамаба и poziotinиба у мутаций Exon20ins в EGFR по сравнению с WT EGFR. Poziotinиб продемонстрировал более низкую селективность в отношении мутаций Exon20ins в EGFR по сравнению с WT EGFR, чем амивантамаб, что позволяет предположить, что  
20 poziotinиб может неблагоприятно влиять на нормальные ткани, тем самым вызывая значительные проявления токсичности, такие как кожная сыпь и диарея (26). Для лучшего понимания механизмов, участвующих в опосредованной амивантамабом клеточной цитотоксичности, авторы изобретения оценили влияние лечения амивантамабом на прогрессирование клеточного цикла и  
25 запрограммированную гибель клеток. Среди клеток Ва/Ф3, экспрессирующих мутации Exon20ins в EGFR D770delinsGY и H773\_V774insH, в клетках, обработанных амивантамабом, наблюдалось накопление клеток в фазе G1 по сравнению с клетками, обработанными несущей средой (Фиг. 1Е). Поскольку сообщалось, что EGFR-TKI стимулируют апоптоз в клетках НМРЛ, несущих  
30 сенсibiliзирующие мутации EGFR (27–29), авторы изобретения исследовали, приводит ли лечение амивантамабом к активации механизма апоптоза. Лечение амивантамабом приводило к индукции проапоптотических белков, включая BIM и расщепленную каспазу 3 (Фиг. 1Ж), что указывает на то, что амивантамаб в

дополнение к ингибированию связанного с EGFR нисходящего сигнального каскада также индуцировал апоптоз ВМ- и каспазозависимым образом.

Пример 3. Амивантамаб демонстрирует противоопухолевую активность в клетках PDC и органоидах

Чтобы расширить выводы авторов изобретения о клетках Ва/Ф3, сконструированных для экспрессии экзогенных мутаций Exon20ins в *EGFR*, авторы изобретения оценили активность амивантамаба в нескольких клетках PDC, содержащих Exon20ins. Противоопухолевую активность амивантамаба и связанные с ней механистические конечные показатели оценивали в клетках PDC, полученных у пациентов с мутациями Exon20ins P772ins\_H773insPNP (DFCI-127), H773\_V774insNPH (DFCI-58) и S768\_D770dup (YU-1163). И в клетках DFCI-127, и в клетках DFCI-58 лечение амивантамабом приводило к снижению уровня экспрессии общего EGFR и cMet, а также ингибированию p-EGFR, p-cMet, p-AKT, p-ERK и p-S6 (Фиг. 2А), что согласуется с результатами, наблюдаемыми в клеточных линиях Ва/Ф3, несущих мутации Exon20ins в *EGFR*. Анализ жизнеспособности клеток и колониобразования показал, что амивантамаб в зависимости от дозы ингибировал рост клеток и пролиферацию клеток PDC по сравнению с контрольными IgG1 (Фиг. 2Б и 2В). В отличие от значительного снижения в EGFR, cMet, p-EGFR, p-cMet, p-AKT и p-S6 в клетках DFCI-127 и DFCI-58, YU-1163, обработанный амивантамабом, неожиданно выявил индукцию p-ERK (Фиг. 2А). В соответствии с этим результатом рост YU-1163 не ингибировался после лечения амивантамабом в течение 72 часов или после длительного лечения (Фиг. 2Б и 2В). Во всех данных секвенирования экзона YU-1163 авторы изобретения наблюдали сопутствующую мутацию в гене *TP53* (R280T; частота встречаемости мутантных аллелей 96%). Согласно последним исследованиям, мутации в *TP53* обычно происходили вместе с мутациями *EGFR* при НМРЛ. В частности, мутации *TP53* в экзоне 8 у пациентов с НМРЛ с мутациями *EGFR* демонстрируют более низкую чувствительность к EGFR-ТКИ и более худший прогноз, чем у пациентов с WT *TP53* (30, 31). Действительно, накопленные исследования показали, что мутация R280T в *TP53* играет решающие роли в пролиферации и выживании раковых клеток, а нокдаун мутантного *TP53* вызывает остановку G2 и апоптоз в клетках рака мочевого пузыря (32, 33). Истощение мутантного *TP53* тремя различными кiРНК, направленными на TP53, значительно ингибировало пролиферацию клеток со снижением активированной ERK в YU-1163, предварительно обработанном амивантамабом в концентрации 1 мг/мл (данные не показаны). Учитывая, что мутантный TP53 связан с

сопротивлением EGFR-ТКИ (34), а обедненный мутант TP53 восстанавливал чувствительность амивантамаба посредством снижения количества p-ERK, индукция p-ERK после лечения амивантамабом в клетках YU-1163 может быть ключевым регулятором выживания клеток, возможно, благодаря перекрестным взаимодействиям между мутантным TP53 и связанным с ERK сигнальным каскадом (35–37). Кроме того, авторы изобретения создали две модели PDO из множества выпотов пациентов, которые имели A767\_V769dup (YUO-036) и S768\_D770dup (YUO-029), чтобы повторить фенотипический и молекулярный ландшафт исходного НМРЛ с Exon20ins в *EGFR* (данные не показаны). YUO-029 был получен у того же пациента, у которого были получены PDC YU-1163 (S768\_D770dup). Как показано на Фиг. 2Г, YUO-036 был чувствителен к амивантамабу дозозависимым образом, тогда как YUO-029, полученный у того же пациента, у которого был получен YU-1163, не показал значительного снижения жизнеспособности клеток после лечения амивантамабом по сравнению с контрольным IgG1 (Фиг. 2Д). Эти вместе взятые результаты показывают, что амивантамаб обладает сильной противоопухолевой активностью в полученных у пациента с НМРЛ раковых клетках с мутациями Exon20ins в *EGFR* за счет снижения модуляции сигнальных путей EGFR и cMet.

Пример 4. EGFR и cMet интернализируются в ответ на амивантамаб

Лечение амивантамабом приводит к снижению модуляции EGFR и cMet, что наблюдается в клетках Ва/Ф3 (Фиг. 1А–1Ж) и PDC (Фиг. 2А–2Д). Согласно многим исследованиям, mAb к EGFR индуцирует интернализацию EGFR, что приводит к снижению регуляции его экспрессии на клеточной поверхности (38, 39). Чтобы исследовать, связывается ли амивантамаб напрямую с EGFR на клетках с мутацией Exon20ins в *EGFR*, клетки Ва/Ф3, сверхэкспрессирующие D770delinsGY или H773\_V774insH, инкубировали с 0,1 мг/мл контрольного IgG1 и 0,1 мг/мл амивантамаба. Для измерения уровня EGFR, связанного с цитоплазматической мембраной, использовали сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Экспрессия EGFR на цитоплазматической мембране начинала снижаться почти вдвое через 30 мин после лечения амивантамабом. Процентное изменение медианной интенсивности флуоресценции (MFI) EGFR по сравнению с клетками, обработанными контрольным IgG1, через 30 минут составило 56% и 68% в D770delinsGY и H773\_V774insH соответственно, а впоследствии оставалось на уровне 40% экспрессии EGFR по сравнению с клетками, обработанными контрольным IgG1, через 72 часа после лечения амивантамабом (таблица 1). Для изучения интернализации cMet, а также EGFR на клетках PDC, содержащих Exon20ins в *EGFR*, клетки PDC DFCI-127 и DFCI-58 обрабатывали амивантамабом в концентрации 0,1 мг/мл и измеряли уровни cMet и EGFR, связанных с цитоплазматической мембраной, через 72 часа после обработки амивантамабом (Фиг. 3А и 3Б). Результаты показали, что амивантамаб снижал уровни EGFR и cMet на клетках PDC по сравнению с контрольным IgG1. Для визуализации интернализации EGFR и cMet после лечения амивантамабом использовали иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание. Лечение амивантамабом в концентрации 0,1 мг/мл в течение 72 часов привело к перераспределению рецепторов EGFR и cMet во внутренние компартменты, тогда как клетки, обработанные IgG, не демонстрировали изменения в схеме окрашивания для EGFR или cMet (данные не показаны). Интернализация и последующее снижение регуляции рецепторов EGFR и cMet посредством лизосом может объяснить снижение уровней белка EGFR и cMet, наблюдаемое в иммуноблоте, FACS и IF-анализах после лечения амивантамабом. Чтобы определить, участвует ли лизосомное разложение в снижении регуляции уровней белка EGFR, клетки Ва/Ф3, сверхэкспрессирующие D770delinsGY и H773\_V774insH, обрабатывали

амивантабом в отсутствие и в присутствии ингибитора аутофагии бафиломицина. Лечение бафиломицином ингибировало разложение EGFR (Фиг. 3B), это позволяет предположить, что снижение модуляции общего уровня белка в EGFR после лечения амивантабом может включать лизосомальное разложение интернализированных рецепторов клеточной поверхности. Эти взятые вместе результаты позволяют предположить, что лечение амивантабом индуцирует интернализацию рецептора и может способствовать наблюдаемым антипролиферативным эффектам амивантаба посредством ингибирования сигнализации, опосредованной EGFR и cMet.

10 **Таблица 1. Экспрессия EGFR на цитоплазматической мембране, обнаруженная в клетках Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770delinsGY и H773\_V774insH**

	Процентное соотношение MFI	
	D770delinsGY	H773_V774insH
30 мин	66,9	68,0
6 ч	68,9	49,1
24 ч	47,6	49,3
48 ч	45,7	46,9
72 ч	44,4	42,9

\*% MFI (медианная интенсивность флуоресценции)

Пример 5. Амивантамаб ингибирует вызванный мутацией Exon20ins в *EGFR* рост моделей Ва/Ф3 и PDC *in vivo*

Чтобы определить, активен ли амивантамаб против опухолей, вызванных мутацией Exon20ins в *EGFR in vivo*, были созданы модели ксенотрансплантатов с использованием клеток Ва/Ф3, несущих мутации Exon20ins D770delinsGY и H773\_V774insH в *EGFR*, и клеток PDC (DFCI-127 и YU-1163), несущих мутации Exon20ins P772insPNP и S768\_D770dup в *EGFR* соответственно. Мышей лечили амивантамабом, контрольным IgG1 или несущей средой в дозировке 30 мг/кг два раза в неделю в/б. У мышей, получавших амивантамаб, наблюдалось уменьшение объема опухоли по сравнению с мышами, получавшими несущую среду или контрольный IgG1, в моделях NOG-мышей, являющихся носителями клеток Ва/Ф3 (Фиг. 4А–4Б). Ингибирование роста опухоли происходило на ранних этапах и сохранялось через 15 суток после лечения. Как показано для клеток Ва/Ф3 и PDC *in vitro*, экспрессия белка EGFR, cMet, p-EGFR и p-cMet была значительно снижена после лечения амивантамабом (Фиг. 4В) в моделях NOG-мышей, являющихся носителями Ва/Ф3. Аналогичным образом, в моделях ксенотрансплантата PDC у мышей, получавших лечение амивантамабом, наблюдалось уменьшение объема опухоли по сравнению с мышами, получавшими несущую среду (Фиг. 4Г–4Д и 4Ж–4З), а также уменьшение уровней белка EGFR, cMet, p-EGFR и p-cMet (Фиг. 4Е и 4И). Интересно, что хотя амивантамабу не удалось ингибировать пролиферацию PDC YU-1163 *in vitro* (Фиг. 2А–2Д), у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, после лечения амивантамабом наблюдалась резкая регрессия опухоли, что позволяет предположить, что противоопухолевому эффекту амивантамаба *in vivo* могут способствовать дополнительные факторы (Фиг. 4Ж). Как указано выше, позитиниб представляет собой адресный агент, который продемонстрировал предварительную клиническую активность при заболевании, вызванном Exon20ins в *EGFR* (23, 24). Авторы изобретения сравнили противоопухолевую активность и безопасность позитиниба с аналогичными показателями для амивантамаба у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163 (S768\_D770dup), и NOG-мышей, являющихся носителями клеток Ва/Ф3, сверхэкспрессирующих D770\_N771insSVD. При использовании ранее описанной схемы дозирования позитиниба 5 мг/кг один раз в два дня (23), внезапная смерть наступила в течение 6 дней лечения. Анализы кожной токсичности при лечении позитинибом и амивантамабом показали, что у

мышей, получавших позиотиниб, при дозировке 5 мг/кг и 10 мг/кг проявлялась сильная кожная токсичность на морде, животе и спине, в то время как амивантамаб в дозировке 30 мг/кг приводил только к появлению минимального кератоза на морде. В дополнение к кожной токсичности у мышей, получавших позиотиниб, в  
5 отличие от мышей, получавших амивантамаб, наблюдалось резкое снижение массы тела. Предпочтительные профили токсичности для амивантамаба были сопоставимы с профилями, показанными в текущем исследовании фазы I (18).

Пример 6. Амивантамаб индуцирует антителозависимую клеточноопосредованную  
цитотоксичность (ADCC) в моделях Exon20ins

Известно, что процесс ADCC инициируется, когда и антиген клетки-мишени, и активированный рецептор Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) взаимодействуют соответственно с Fab- и Fc-участками антитела. Эффекторные клетки, в основном натуральные киллерные клетки (NK), запускают дегрануляцию и последующую продукцию цитокинов, что приводит к элиминированию клеток-мишеней (40). Чтобы определить, играет ли ADCC какую-либо роль в опосредованной амивантамабом противоопухолевой активности, анализы ADCC проводили с использованием клеток PDC (DFCI-127 и YU-1163), экспрессирующих мутации Exon20ins в *EGFR*, совместно культивируемых с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) в качестве эффекторных клеток (E : T = 50 : 1). Лечение амивантамабом приводило к цитотоксичности в клетках PDC обоих типов в зависимости от дозы и в большей степени, чем цетуксимаб, моноклональное антитело, нацеленное на EGFR (Фиг. 5А–5Б). Кроме того, лечение цетуксимабом приводило к менее выраженному уменьшению объема опухоли в моделях бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, по сравнению с уменьшением, наблюдаемым при лечении амивантамабом (данные не показаны). Опосредованная амивантамабом клеточная цитотоксичность, продемонстрированная на Фиг. 5А, была значительно снижена при инкубации с блокатором рецептора Fc (FcR) в клетках PDC DFCI-127 и YU-1163 (Фиг. 5В), что позволяет предположить, что эффект ADCC, опосредованный амивантамабом, требует взаимодействия с FcR на PBMC. Аналогично, противоопухолевый эффект амивантамаба *in vivo* подавлялся, когда амивантамаб совместно обрабатывали антителами к CD16/CD32 мышей для блокирования FcR $\gamma$ III/FcR $\gamma$ II на моноцитах/макрофагах и NK-клетках у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163 (данные не показаны). Известно, что воспалительные цитокины, такие как IFN- $\gamma$  и TNF $\alpha$ , секретируются из инфицированных моноцитов и активированных NK-клеток во время ADCC, стимулируя презентацию антигена и адаптивные иммунные ответы (41–43). Чтобы исследовать корреляцию между зависимой от амивантамаба ADCC и уровнями секретируемого IFN- $\gamma$ , авторы изобретения измерили уровень IFN- $\gamma$  в среде, культивируемой совместно с клетками PDC и PBMC после лечения амивантамабом. В соответствии со степенью эффекта ADCC уровни IFN- $\gamma$  были значительно более высокими при лечении амивантамабом по сравнению с

лечением цетуксимабом (Фиг. 5Г). Лечение блокатором FcR снижало секрецию IFN- $\gamma$ , что указывало на то, что секреция IFN- $\gamma$  зависела от взаимодействия между Fc-доменом амивантамаба и FcR на иммунных клетках (Фиг. 5Д). Индуцированные воспалительные цитокины, включающие IFN- $\gamma$ , секретируемые из активированных амивантамабом NK-клеток, которые связываются с EGFR и cMet в опухолях, вызванных Exon20ins в *EGFR*, могут приводить к рекрутингу и активации иммунных клеток, смежных к опухолевым клеткам *in vivo*. Чтобы исследовать это, авторы изобретения проанализировали инфильтрацию макрофагов и NK-клеток в опухоль в модели PDX (УНИМ-1029), которая была получена из полученной от пациента опухоли, содержащей мутацию Exon20ins D770\_N771insG (Фиг. 6А), и моделей бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, получавших лечение амивантамабом в дозировке 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. После лечения амивантамабом в опухолях у бестимусных мышей линии BALB/c были повышены уровни mF4/80 и mNKp46, маркеров макрофагов и NK-клеток соответственно, что позволяет предположить, что механистические компоненты ADCC, наблюдаемые *in vitro*, могут перейти к рекрутированию ключевых эффекторных клеток в опухолях *in vivo* (данные не показаны). Кроме того, эти результаты свидетельствуют о том, что амивантамаб обладает более большой ADCC и противоопухолевой активностью, чем цетуксимаб в контексте Exon20ins в *EGFR*, и что ADCC является важным механизмом опосредования цитотоксических эффектов амивантамаба.

Пример 7. Амивантамаб демонстрирует противоопухолевую активность в модели PDX, содержащей мутацию Exon20ins D770\_N771insG

Лечение амивантамабом в модели PDX (УНИМ-1029) приводило к устойчивому снижению объема опухоли, что указывает на то, что

5 противоопухолевая активность, наблюдаемая в моделях Ва/Ф3 и PDC, была сохранена в модели PDX. Напротив, лечение цетуксимабом (10 мг/кг) или позитинибом (1 мг/кг) уменьшало объем опухоли лишь незначительно (Фиг. 6Б). В данном эксперименте доза позитиниба была снижена до 1 мг/кг из-за описанной выше токсичности позитиниба (данные не показаны). Фармакодинамический

10 анализ показал, что лечение амивантамабом приводило к снижению модуляции EGFR и cMet, ингибированию нисходящих сигнальных путей p-AKT, p-ERK и p-S6 и повышению уровней маркеров апоптоза (Фиг. 6В). Напротив, в опухолях мышей, получавших лечение цетуксимабом или позитинибом, сохранялись компоненты нисходящего сигнального пути EGFR p-ERK и p-S6 (Фиг. 6Г), что согласуется с

15 умеренными эффектами, наблюдаемыми в отношении роста опухоли. Гистопатологическое исследование срезов опухоли, полученных после лечения амивантамабом или несущей средой, с использованием окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) и иммуногистохимического окрашивания для окрашивания EGFR, cMet, Ki-67 и TUNEL, дополнительно подтвердило

20 ингибирование рецепторов и участие апоптического механизма в опухолях, вызванных Exon20ins в *EGFR in vivo* (данные не показаны). Чтобы проверить, влияет ли на противоопухолевый эффект амивантамаба врожденный иммунитет в моделях *in vivo*, авторы изобретения блокировали мышиный CD16/32 путем введения антител к anti-CD16/CD32. Противоопухолевый эффект амивантамаба,

25 показанный на Фиг. 6Б, исчезал, когда бестимусные мыши линии BALB/c, являющиеся носителями PDX, получавшие амивантамаб, одновременно получали антитела к anti-CD16/CD32, что указывает на то, что в этих условиях противоопухолевые эффекты амивантамаба были частично опосредованы иммунными клетками (данные не показаны).

Пример 8. Противоопухолевая активность амивантамаба у пациентов с заболеванием, вызванным Exon20ins в EGFR

Потенциальный благоприятный клинический эффект амивантамаба оценивали в продолжающемся двухэтапном исследовании фазы 1 применения амивантамаба у пациентов с НМРЛ на поздней стадии (NCT02609776). На Фиг. 7 показан план исследования.

Представленный в данном документе анализ включает в себя всех включенных в исследование пациентов с мутациями Exon20ins, которые получали рекомендованную на фазе 2 дозу (RP2D) в 1050 мг (1400 мг для пациентов с массой тела  $\geq 80$  кг) амивантамаба внутривенно один раз в неделю в течение первого цикла; а затем два раза в неделю. Популяция безопасности (N = 50) включала в себя всех пациентов, которые получали амивантамаб в дозе RP2D, а популяция, в которой можно провести оценку ответа (n = 39), включала в себя пациентов, у которых было по меньшей мере 2 оценки заболевания, или у которых терапия была прекращена. Нежелательные явления (НЯ) были оценены в соответствии с Общими терминологическими критериями для обозначения нежелательных явлений, вер. 4.03. Ответ оценивался исследователем в соответствии с Критериями ответа солидных опухолей, вер. 1.1.

**Пациенты.** В частях 1 и 2 клинического исследования 50 пациентов с НМРЛ с мутациями Exon20ins в EGFR получали по меньшей мере одну порцию амивантамаба в дозе RP2D; среди этих пациентов 39 относились к популяции, в которой можно провести оценку ответа с использованием 13 различных изменений Exon20ins в EGFR (таблица 2).

**Таблица 2. Демографические характеристики и характеристики заболеваний пациентов из популяции, в которой можно провести оценку ответа**

	<b>Всего (N = 39)</b>
Медианный возраст, лет (диапазон)	61 (40–78)
Мужской/женский пол, n (%)	19 (49) / 20 (51)
Расовая принадлежность, n (%)	
Азиаты	25 (64)
Черный	1 (3)
Европеоиды	11 (28)
Не сообщено	2 (5)

	<b>Всего (N = 39)</b>
ECOG PS, n (%)	
0	14 (36)
1	24 (62)
2	1 (3)
Медианное время от первоначального диагноза, месяцев (диапазон)	12 (1–56)
Аденокарцинома, n (%)	39 (100)
Мутации Exon20ins, n (%)	39 (100)
Медианные предшествующие линии, n (диапазон)	1 (0–7)
Ранее перенесенные системные терапии, n (%)	33 (85)
Химиотерапия на основе препаратов платины <sup>a</sup>	29 (74)
Иммуноонкологическая терапия <sup>b</sup>	13 (33)
TKI EGFR	9 (23)
Бевацизумаб	4 (10)
Предшествующая терапия не проводилась	6 (15)

<sup>a</sup>В метастатической стадии, <sup>b</sup>ниволумаб, атезолизумаб, пембролизумаб, дурвалумаб; ECOG PS = общее состояние по шкале Восточной объединенной онкологической группы; EGFR = рецептор эпидермального фактора роста; TKI = ингибитор тирозинкиназы

5

**Безопасность.** НЯ регистрировали у 96% пациентов, получавших дозу RP2D, и в основном они относились к степеням 1 или 2 (60%; таблица 3).

Снижение дозы (5 [10%]) и прекращение лечения (3 [6%]) из-за НЯ были редкими; ни в одном случае приостановка введения или изменение доз не были связаны с тяжелой токсичностью стабильного характера. Наиболее распространенными НЯ всех степеней тяжести были сыпь, инфузионная реакция и паронихия (табл. 3).

10

Инфузионная реакция возникала преимущественно при первой инфузии и не препятствовала последующему лечению. Не сообщалось о возникновении сыпи со степенью тяжести  $\geq 3$ , сообщалось о диарее 3 степени тяжести у 1 пациента (всего

15

диарея различных степеней тяжести возникала у 3 [6%] пациентов). У 3 (6%)

пациентов возникали связанные с лечением НЯ со степенью тяжести  $\geq 3$ :

гиперамиллаземия, гипокалиемия, повышение уровня липазы и боль в плече /

грудной клетке. Связанные с лечением серьезные НЯ (целлюлит, интерстициальное заболевание легких и боль в плече / грудной клетке) были зарегистрированы у 3 (6%) пациентов.

- НЯ, приводящие к смерти, не были признаны связанными с лечением.

**Таблица 3. Нежелательные явления (НЯ) у пациентов, получавших лечение в дозе RP2D (популяция безопасности)**

<b>НЯ в популяции безопасности, n (%)</b>	<b>Всего (N = 50)</b>
Любое НЯ	48 (96)
Серьезное НЯ	14 (28)
Степень НЯ $\geq 3$	18 (36)
НЯ, приведшие к смерти ( <i>все не связанные с амивантамабом</i> )	4 (8)
НЯ, приведшие к исключению из исследования	3 (6)
НЯ, приведшие к снижению дозы	5 (10)
НЯ, приведшие к приостановке введения дозы <sup>a</sup>	15 (30)
<b>НЯ всех степеней (<math>\geq 15\%</math>), n (%)</b>	<b>Всего (N = 50)</b>
Сыпь <sup>b</sup>	36 (72)
Инфузионная реакция	30 (60)
Паронихия	17 (34)
Запор	13 (26)
Гипоальбуминемия	11 (22)
Диспноэ	10 (20)
Утомляемость	9 (18)
Боль в спине	8 (16)
Стоматит	8 (16)

а — исключая инфузионную реакцию, b — включая угревой дерматит, сыпь, крапивницу, макулопапулезную сыпь, пустулезную сыпь, папулезную сыпь, эритему, генерализованную эритему, эритематозную сыпь, макулы, промежностную сыпь, зудящую сыпь, дерматит; НЯ = нежелательное явление; RP2D = рекомендованная доза для фазы 2.

**Эффективность.** У пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины, а также у пациентов, ранее не получавших лечение, наблюдалось уменьшение целевых поражений (Фиг. 8). Активность наблюдалась во всех 13 различных идентифицированных изменениях Exon20ins в EGFR. Общая доля ответов (ORR), только подтвержденных ответов, составила 36% (95% доверительный интервал [ДИ], 21–53), при этом от 14 из 39 пациентов были

получены частичные ответы (Фиг. 9). ORR у пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины, составила 41% [95% ДИ, 24–61] (Фиг. 9). Частота клинической эффективности (частичный ответ или более лучшее или стабильное заболевание по меньшей мере за 12 недель [2 оценки заболевания]) составила 67% (95% ДИ, 50–81) для всех пациентов и 72% (95% ДИ, 53–87) для пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины. Ответы в основном были получены в течение 2 месяцев лечения (Фиг. 10). При медианном 4-месячном (диапазон, 1–26) последующем наблюдении медианная длительность ответа (mDOR) для всех оцененных пациентов составила 10 месяцев (диапазон, 1–16; Фиг. 10). Для пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины, mDOR составила 7 месяцев (диапазон, 1–16) (Фиг. 10). На момент прекращения сбора данных 9/14 (64%) пациентов имели текущие ответы; 7/12 (58%) пациентов, у которых на фоне химиотерапии на основе препаратов платины наблюдалось прогрессирование заболевания, продолжают лечение с постоянным ответом. Медианная выживаемость без признаков прогрессирования (mPFS) составила 8,3 месяца (95% ДИ, 3,0–14,8) среди всех пациентов при значительном цензурировании на раннем этапе (Фиг. 11). Пациенты, прошедшие химиотерапию на основе препаратов платины, имели mPFS 8,6 месяцев (95% ДИ, 3,7–14,8; Фиг. 11).

Клиническая активность амивантамаба наблюдалась у пациентов с заболеванием, вызванным Exon20ins в *EGFR*. Пациент в возрасте 58 лет с мутацией Exon20ins H773delinsNPY в *EGFR* достиг частичного ответа с уменьшением опухоли на 65% (Фиг. 12А), а пациент в возрасте 48 лет с мутацией Exon20ins S768\_D770dup в *EGFR* достиг частичного ответа с уменьшением опухоли на 38,9% (Фиг. 12Б). У этих пациентов отсутствовали признаки прогрессирования в течение 92 и 32 недель соответственно при лечении амивантамабом с управляемой токсичностью.

Было замечено, что у пациентов с НМРЛ ген *EGFR* и ген-супрессор опухоли TP53 обычно мутируют с независимыми прогностическими последствиями. Кроме того, для пациентов с сопутствующими мутациями в *EGFR* и TP53 сообщалось о снижении чувствительности к EGFR-ТКИ (53). Аналогичный эффект наблюдался в нашем исследовании для PDC YU-1163 и PDO YUO-029 после лечения амивантамабом. С другой стороны, амивантамаб проявлял сильную активность *in vivo* у бестимусных мышей линии BALB/c, являющихся носителями YU-1163, что

позволяет предположить, что ADCC-активность амивантамаба, показанная на Фиг. 5А–5Д, как полагают, участвует в противоопухолевой активности *in vivo*. Эти результаты позволяют предположить, что комбинация вызываемых амивантамабом МОА, зависимых и независимых от эффекторных клеток (Фиг. 12В), может приводить к противоопухолевой активности в опухолях, содержащих комбинацию трудноизлечимых мутаций, например при заболевании, вызванном Exon20ins в EGFR, и сопутствующими вредными мутациями, такими как мутация TP53, присутствующая в нашей доклинической модели и описанная для более широкой популяции пациентов.

10 **Выводы.** Амивантамаб имеет управляемый профиль безопасности у пациентов с заболеванием, вызванным Exon20ins, получающих лечение в дозе RP2D. Токсичности были в основном 1–2 степени и соответствовали ингибированию активности EGFR. Не сообщалось о случаях сыпи  $\geq 3$  степени, и сообщалось только об 1 случае диареи 3 степени. Ответы наблюдались у

15 пациентов, ранее не получавших лечение, и у пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины. ORR составила 36% для всех пациентов и 41% для пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины. Ответы были устойчивыми, mDOR составила 10 месяцев для всех пациентов и 7 месяцев для пациентов, прошедших химиотерапию на основе

20 препаратов платины. При лечении амивантамабом mPFS составила 8,3 месяцев для всех пациентов и 8,6 месяцев для пациентов, прошедших химиотерапию на основе препаратов платины. На основании этих данных FDA признало амивантамаб новым препаратом в качестве терапии прорыва для лечения пациентов с НМРЛ с Exon20ins в EGFR, заболевание которых прогрессировало во время или после

25 химиотерапии на основе препаратов платины.

Дополнительные данные из данного клинического исследования, включающего 114 пациентов (группа безопасности) и 81 пациента (группа оценки эффективности), соответствовали данным, описанным выше. В частности, амивантамаб продемонстрировал устойчивую эффективность с ORR 40% и

30 медианную длительность ответа 11,1 месяцев. Медианная выживаемость без признаков прогрессирования (mPFS) составила 8,3 месяца. Профиль безопасности у этих пациентов был приемлемым, при этом связанные с лечением нежелательные явления в основном относились к 1–2 степени (16% — к степени  $\geq 3$ ).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

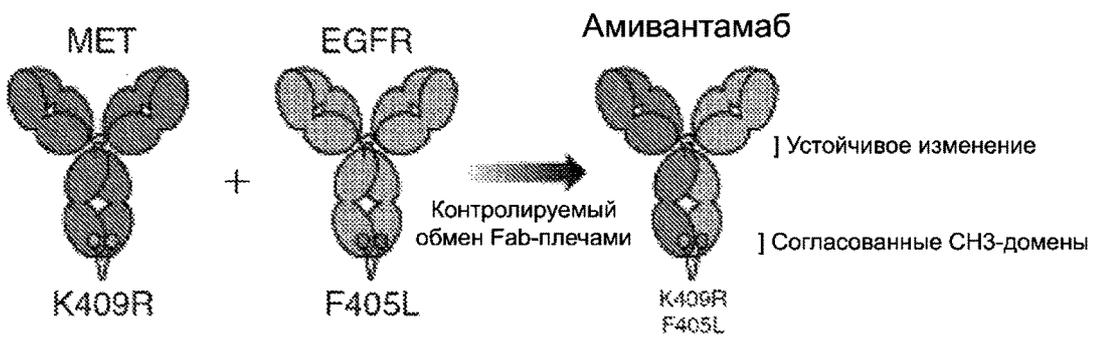
1. Способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак, который является положительным в отношении мутации экзона 20 в EGFR.
2. Способ по п. 1, включающий:
  - а) получение биологической пробы субъекта;
  - б) определение наличия или отсутствия мутации экзона 20 в EGFR в пробе; и
  - в) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет мутацию экзона 20 в EGFR.
3. Способ лечения субъекта, имеющего рак, который является положительным в отношении мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X (где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от G), включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) / рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met) субъекту, имеющему рак.
4. Способ по п. 3, включающий:
  - а) получение биологической пробы субъекта;
  - б) определение наличия или отсутствия мутации EGFR S768I, L861Q и/или G719X в пробе; и
  - в) введение или обеспечение введения биспецифического антитела к EGFR/с-Met субъекту, который, как определено, имеет мутацию S768I, L861Q и/или G719X.
5. Способ по любому из пп. 1–4, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первый домен, который специфически связывается с EGFR, и второй домен, который специфически связывается с с-Met, причем первый домен содержит определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи

- (HCDR1) с SEQ ID NO: 1, HCDR2 с SEQ ID NO: 2, HCDR3 с SEQ ID NO: 3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) с SEQ ID NO: 4, LCDR2 с SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с SEQ ID NO: 6, и при этом второй домен, который связывается с с-Met, содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 7, HCDR2 с SEQ ID NO: 8, HCDR3 с SEQ ID NO: 9, LCDR1 с SEQ ID NO: 10, LCDR2 с SEQ ID NO: 11 и LCDR3 с SEQ ID NO: 12.
- 5
6. Способ по любому из пп. 1–5, в котором первый домен, который специфически связывается с EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 13 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 14, а второй домен, специфически связывающийся с с-Met, содержит VH с SEQ ID NO: 15 и VL с SEQ ID NO: 16.
- 10
7. Способ по любому из пп. 1–6, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met представляет собой изотип IgG1.
- 15
8. Способ по любому из пп. 1–7, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 17, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 19 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 20.
- 20
9. Способ по любому из пп. 1–8, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met содержит биантенарную структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%.
- 25
10. Способ по любому из пп. 1–9, в котором у субъекта наблюдается рецидив или резистентность к лечению одной или более предшествующими противораковыми терапиями.
- 30
11. Способ по п. 10, в котором одна или более предшествующих противораковых терапий содержат один или более химиотерапевтических препаратов, ингибиторов контрольной точки, нацеленные противораковые терапии, или ингибиторы киназы, или любую их комбинацию.

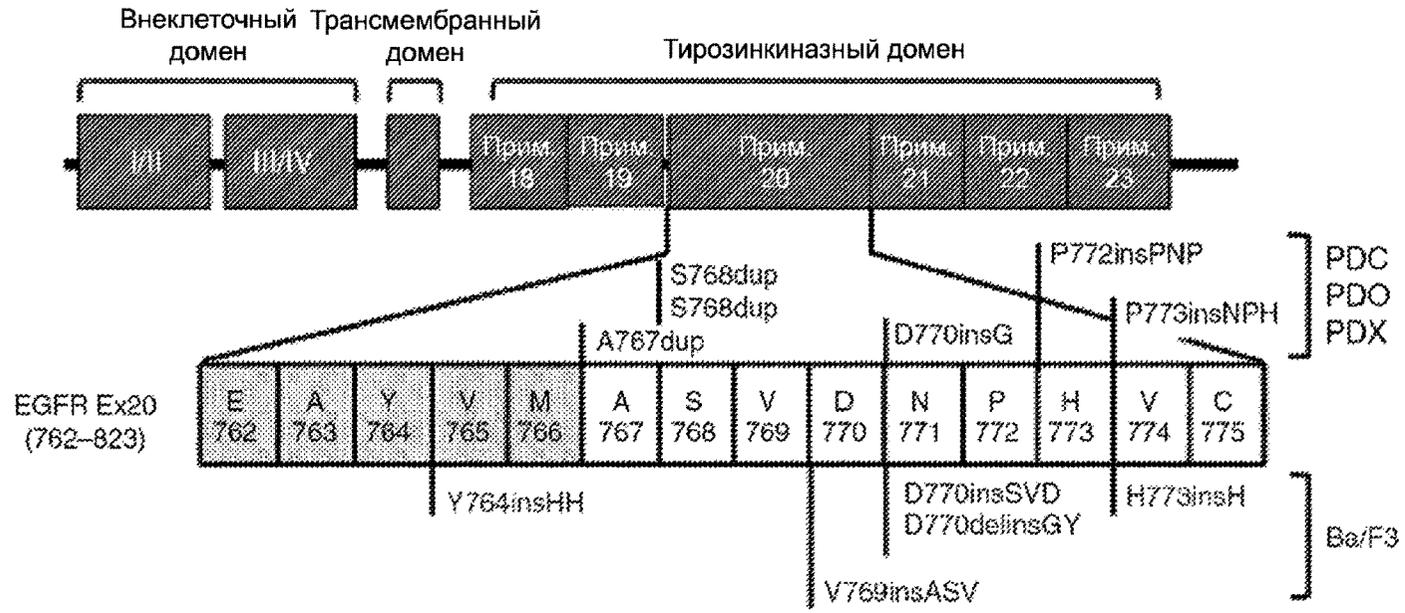
12. Способ по п. 10, в котором одна или более предшествующих противораковых терапий содержат карбоплатин, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, винорелбин, доцетаксел, пальбоциклиб, кризотиниб, ингибитор оси PD-(L)1, ингибитор EGFR, ингибитор c-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR, ингибитор AXL, эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, лазертиниб, позиотииниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб, или сунитиниб, или любую их комбинацию.
13. Способ по любому из пп. 1–4, в котором субъект ранее не получал лечение.
14. Способ по любому из пп. 1–4, в котором рак представляет собой рак легкого, рак желудка, колоректальный рак, рак головного мозга, рак, происходящий из эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичка, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), или спорадическую или наследственную папиллярную почечно-клеточную карциному (PRCC), или любую их комбинацию.
15. Способ по п. 14, в котором рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или аденокарциному легкого, легочную саркоматоидную карциному или любую их комбинацию.
16. Способ по любому из пп. 1–4, включающий дополнительное получение субъектом одной или более противораковых терапий.
17. Способ по п. 16, в котором одна или более противораковых терапий представляют собой химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, нацеленную противораковую терапию, ингибитор киназы или любую их комбинацию.

18. Способ по п. 17, в котором ингибитор киназы представляет собой ингибитор EGFR, ингибитор с-Met, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор VEGFR или ингибитор AXL.
- 5
19. Способ по п. 18, в котором ингибитор киназы представляет собой лазертиниб, poziотиниб, эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб, криотиниб, кабозантиниб, капматиниб, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб или сунитиниб.
- 10
20. Способ по п. 1 или 2, в котором мутация экзона 20 в EGFR представляет собой мутацию *de novo*.
21. Способ по п. 1 или 2, в котором мутация экзона 20 в EGFR представляет собой
- 15 приобретенную мутацию.
22. Способ по любому из пп. 1–21, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met вводят в дозе от около 140 мг до около 1750 мг.
- 20
23. Способ по любому из пп. 1–22, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met вводят в дозе около 700 мг, около 750 мг, около 800 мг, около 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг или 1400 мг.
- 25
24. Способ по любому из пп. 1–23, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met вводят в дозе 1050 мг.
25. Способ по любому из пп. 1–23, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met вводят в дозе 1400 мг.
- 30
26. Способ по любому из пп. 1–25, в котором биспецифическое антитело к EGFR/с-Met вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

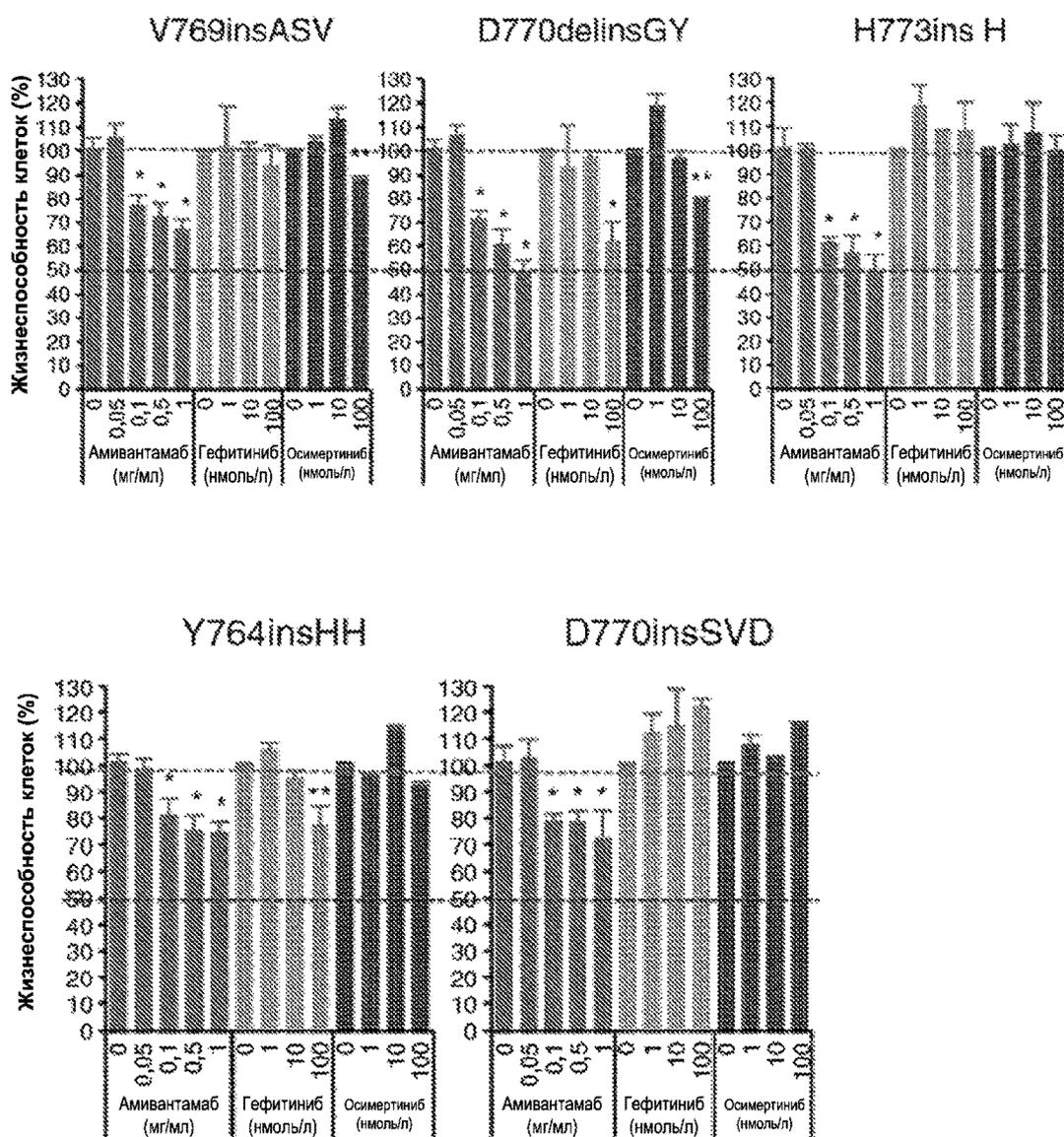
Фиг. 1А

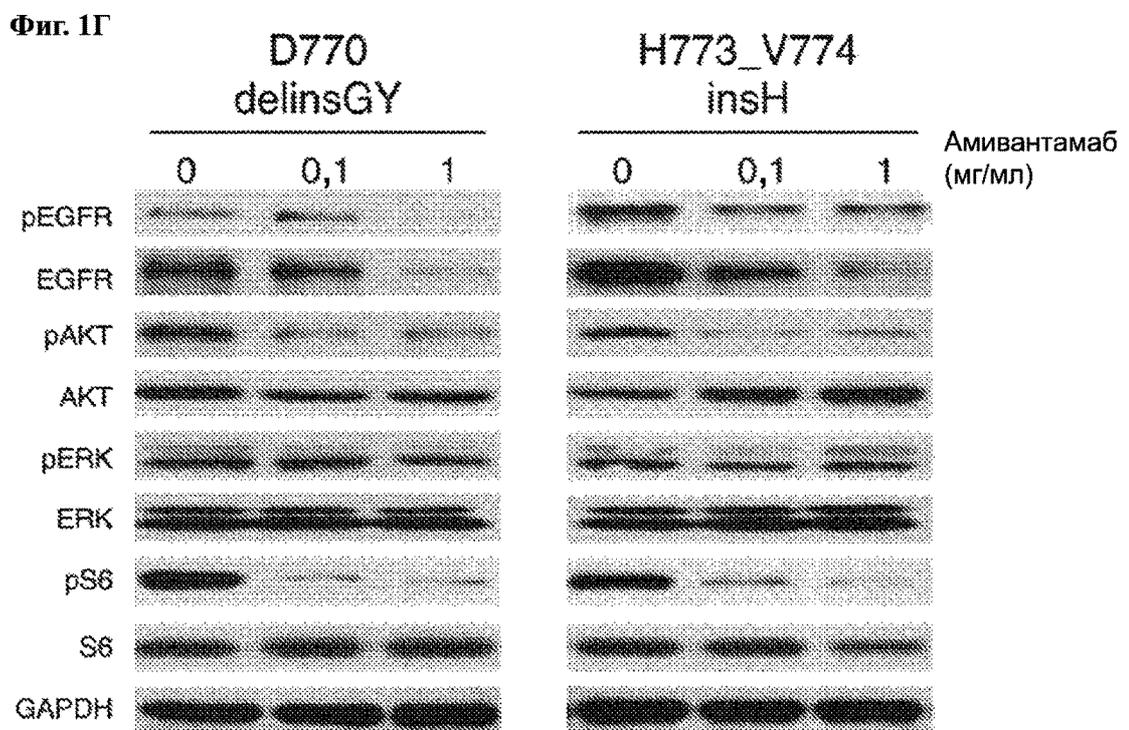


Фиг. 1Б

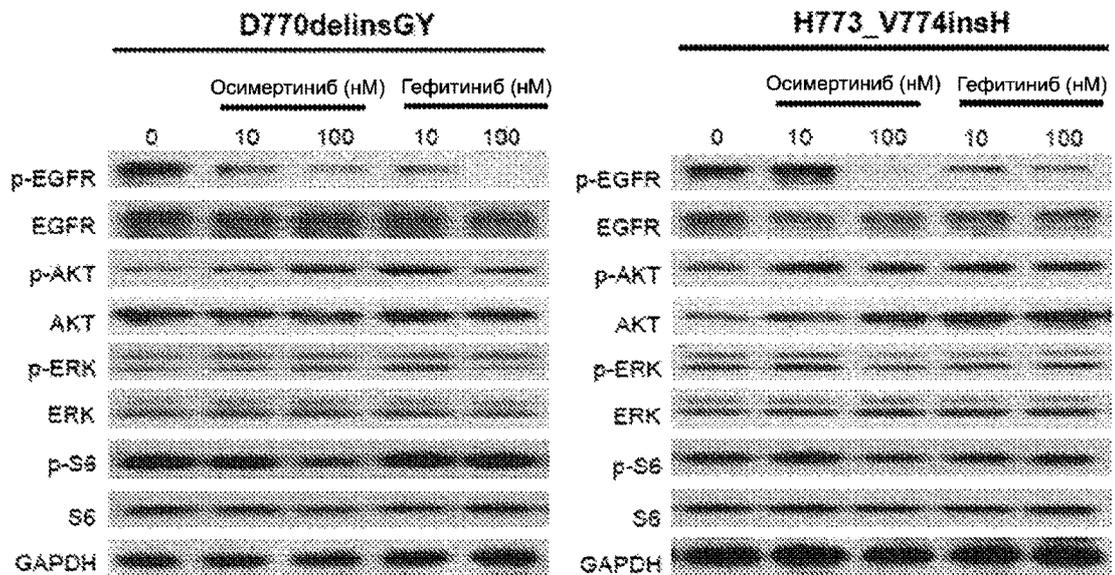


Фиг. 1В

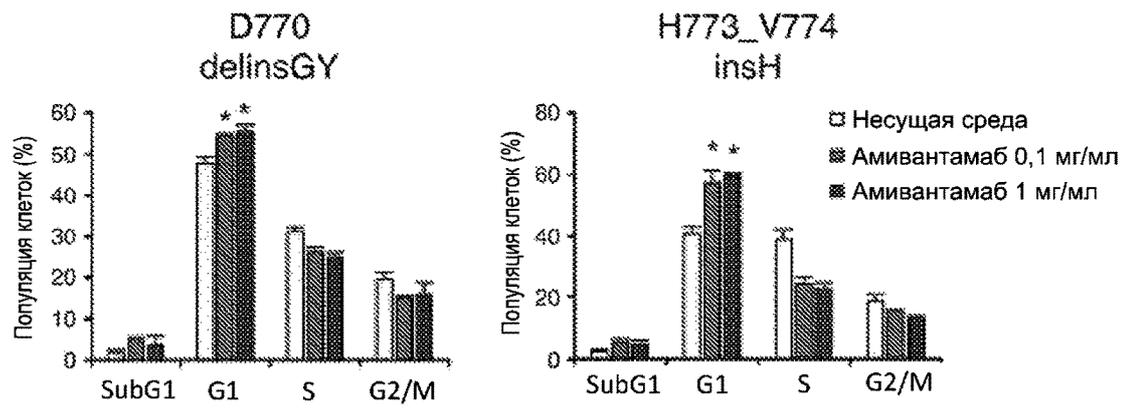




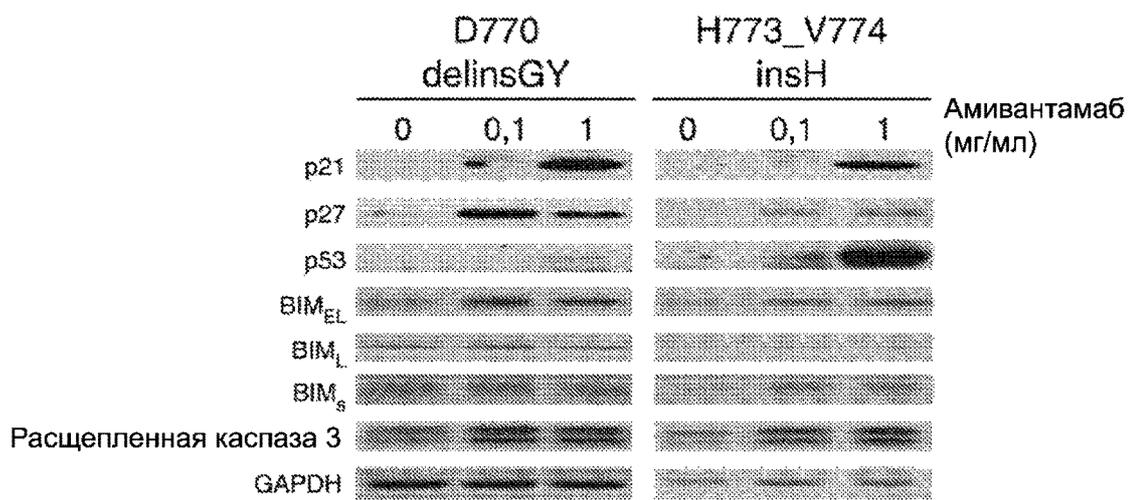
Фиг. 1Д



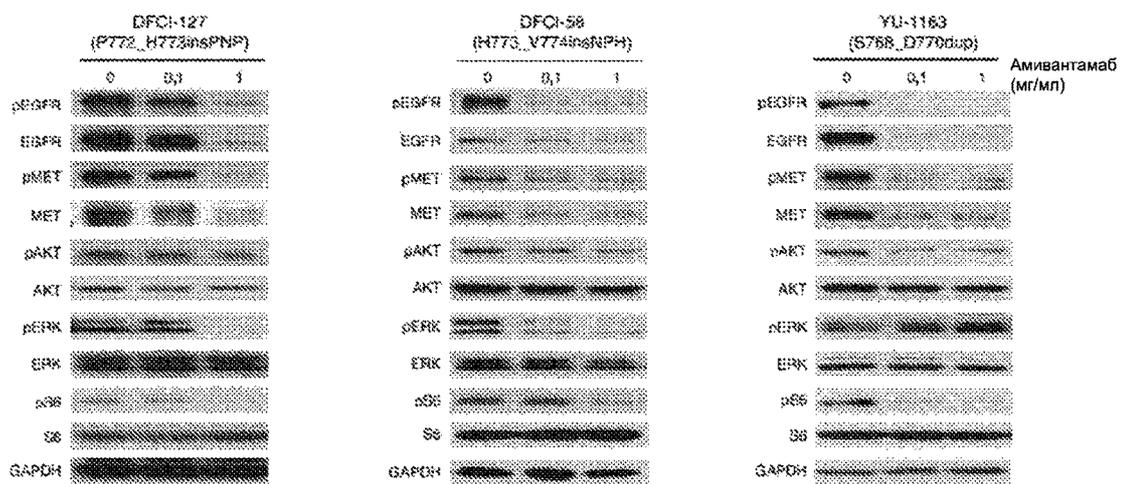
Фиг. 1Е



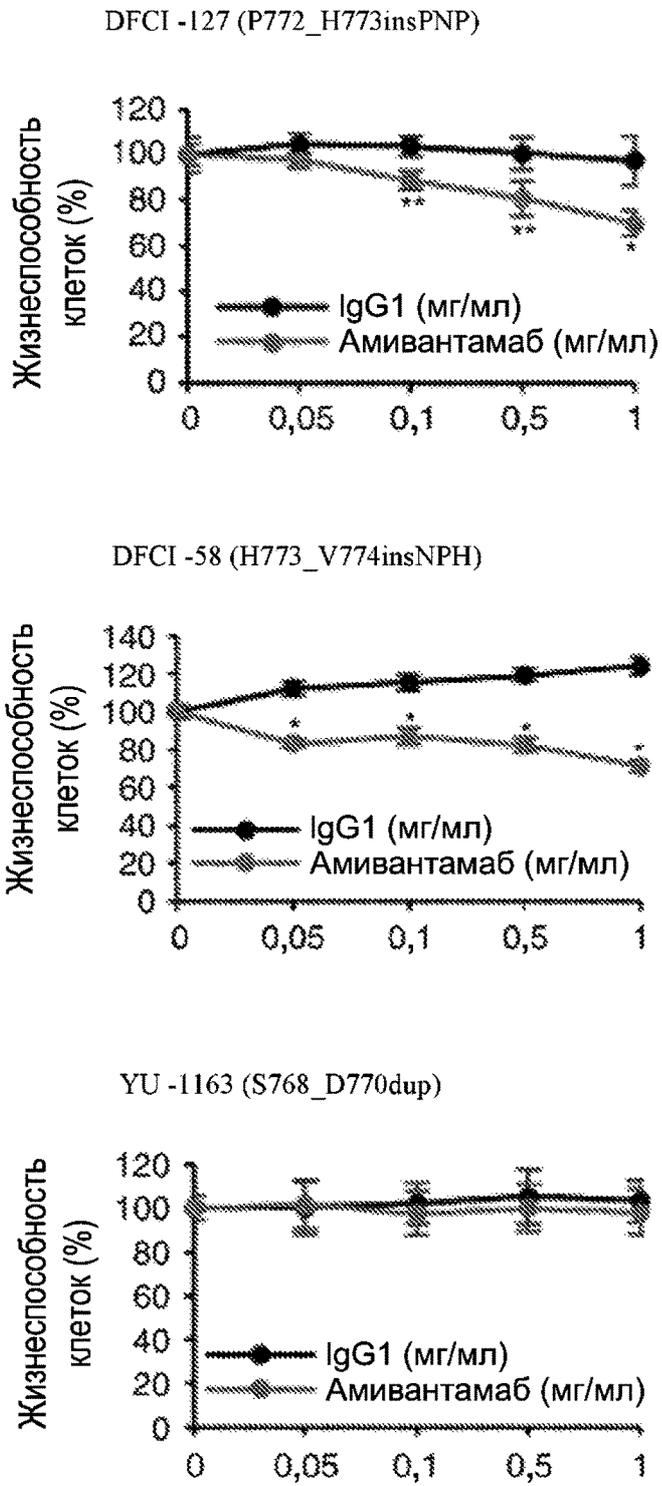
Фиг. 1Ж



Фиг. 2А

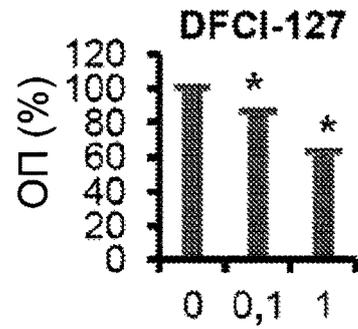


Фиг. 2Б

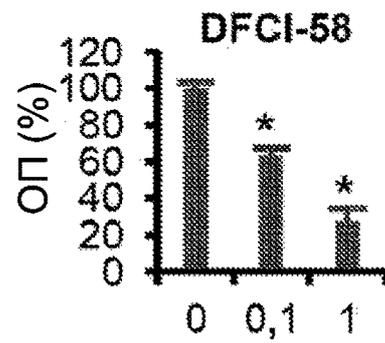


Фиг. 2В

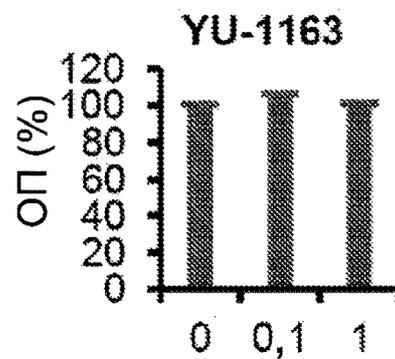
DFCI -127 (P772\_H773insPNP)



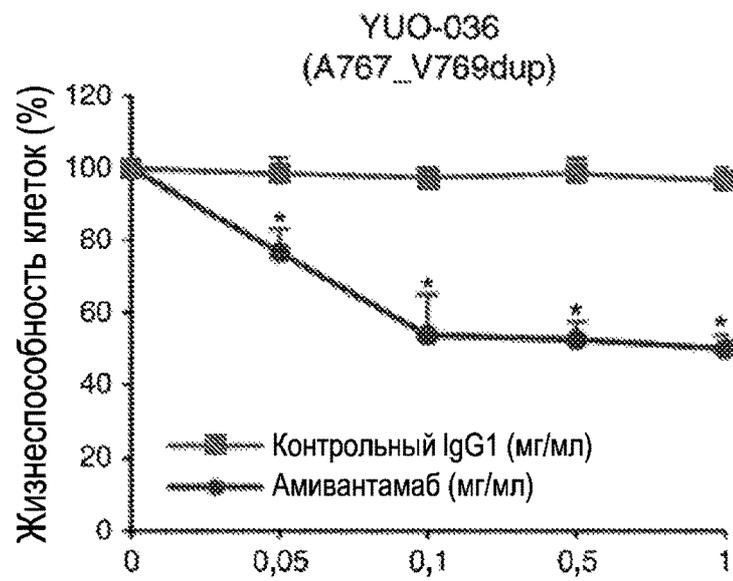
DFCI -58 (H773\_V774insNPH)



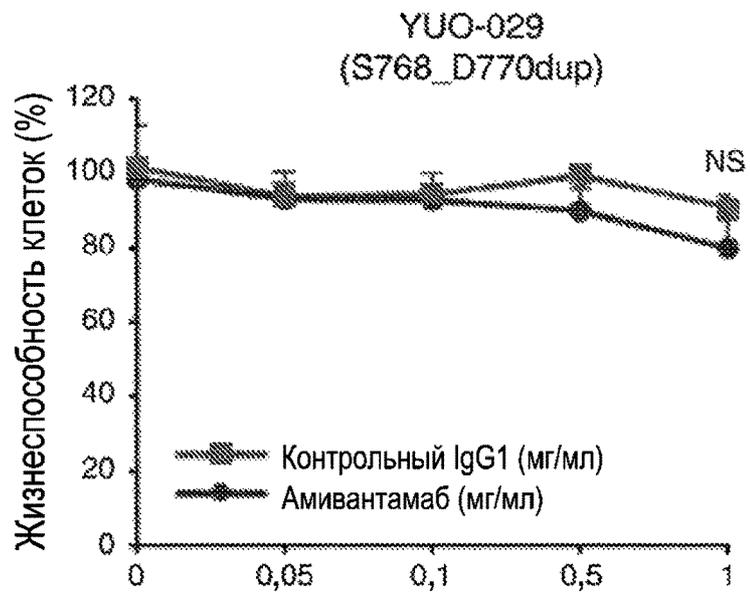
YU -1163 (S768\_D770dup)



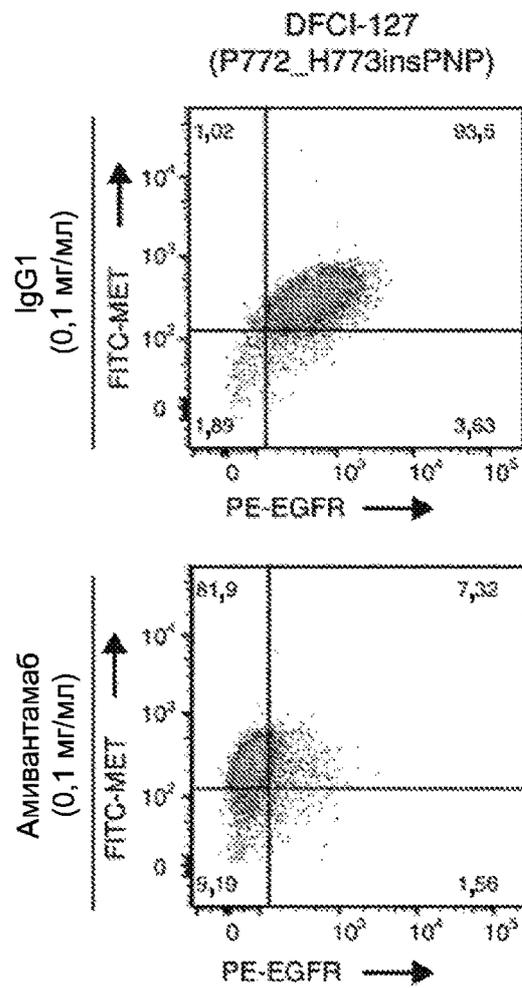
Фиг. 2Г



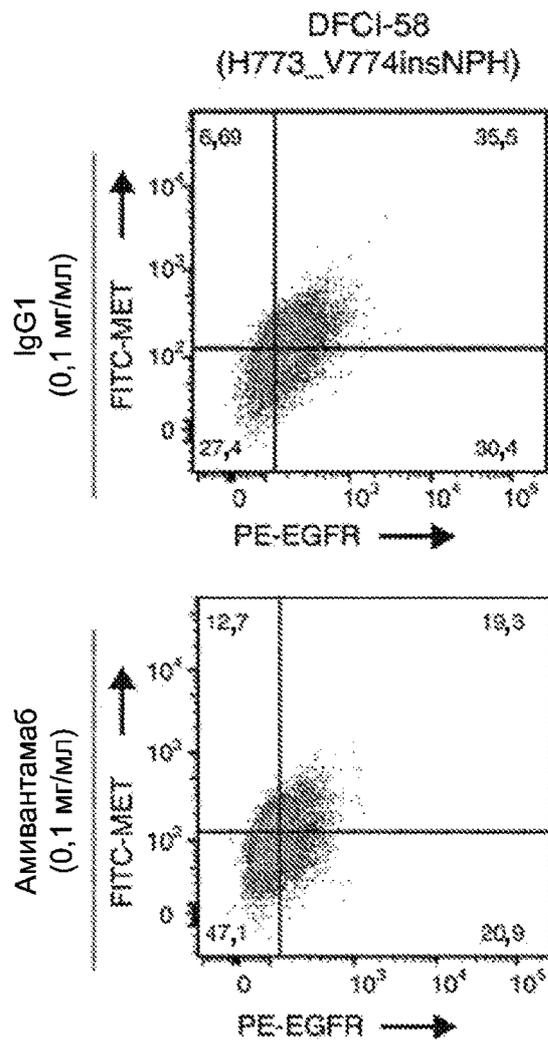
Фиг. 2Д



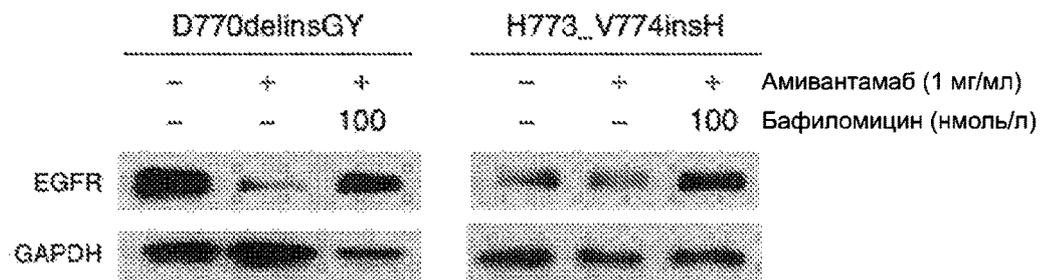
Фиг. 3А



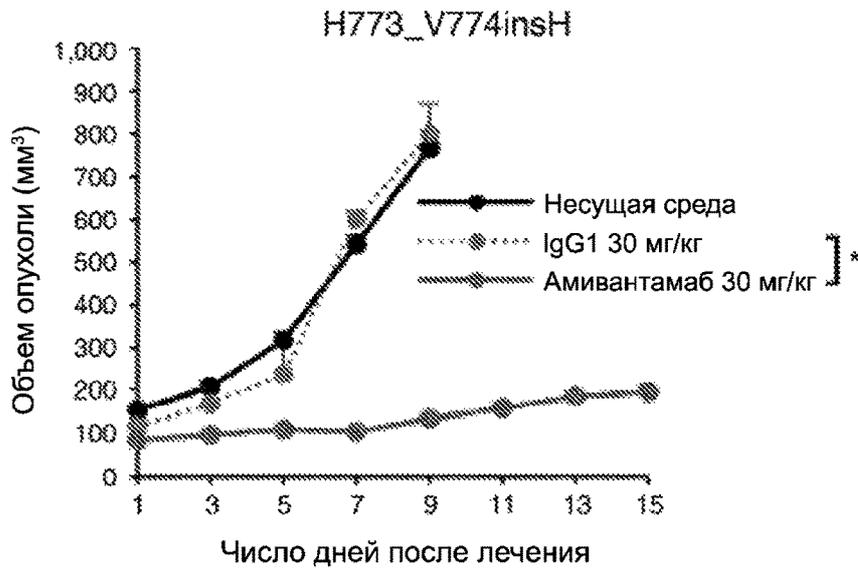
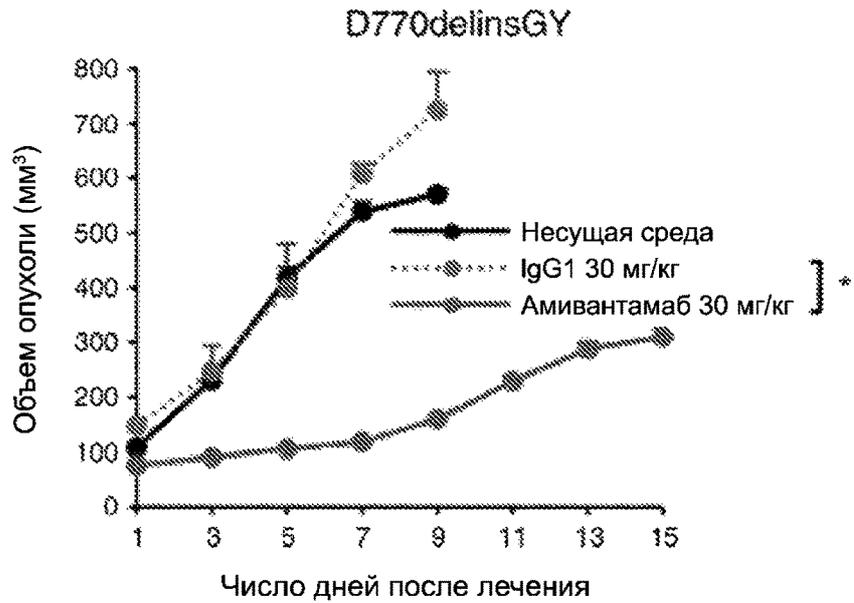
Фиг. 3Б



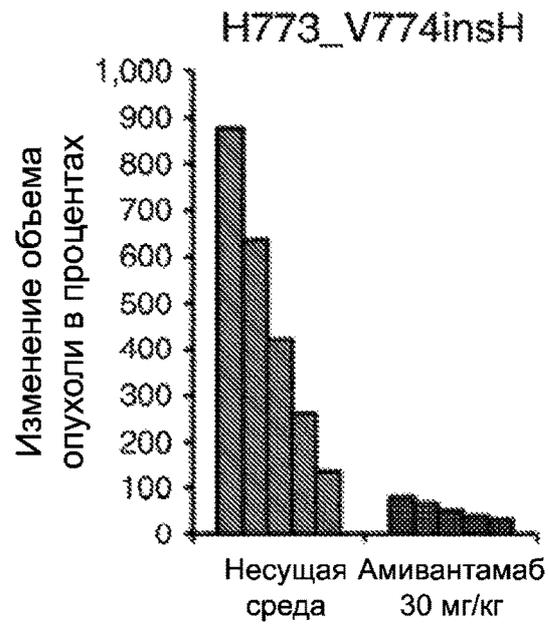
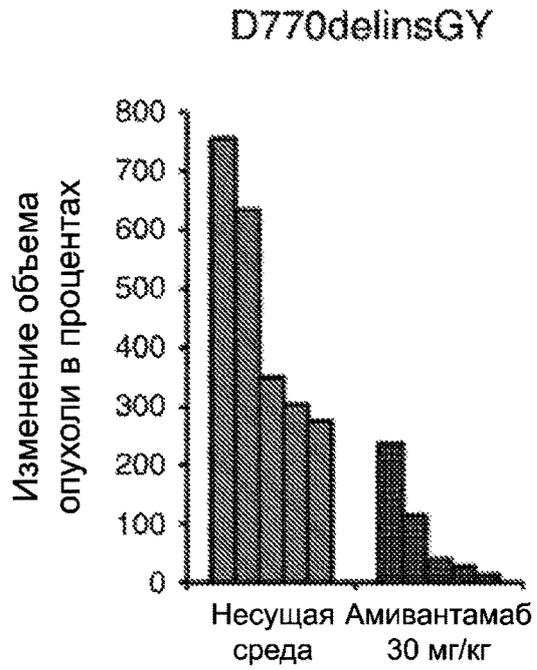
Фиг. 3В



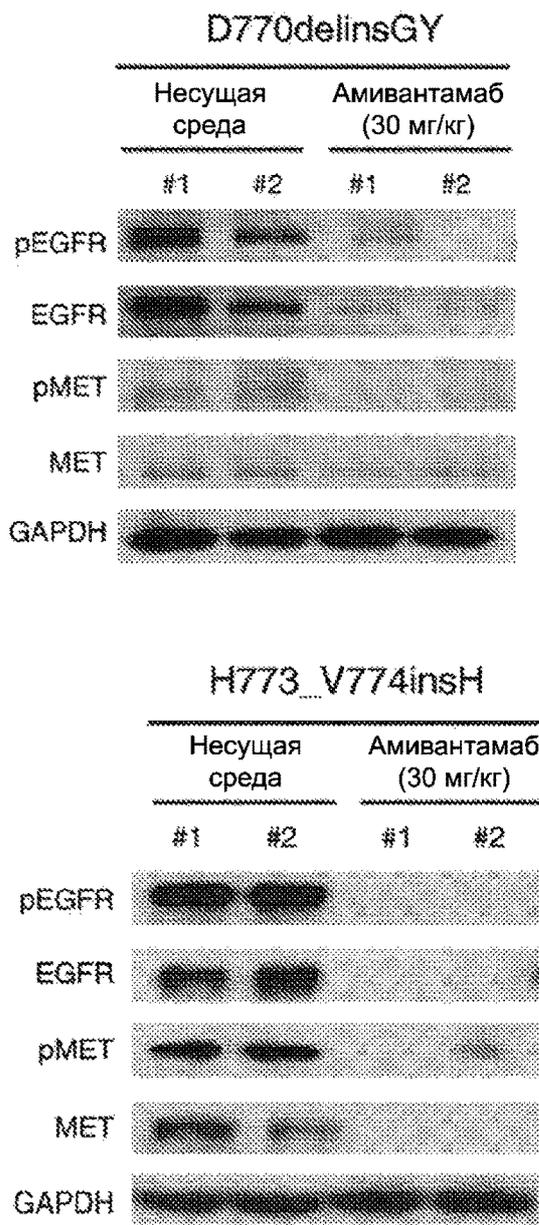
Фиг. 4А



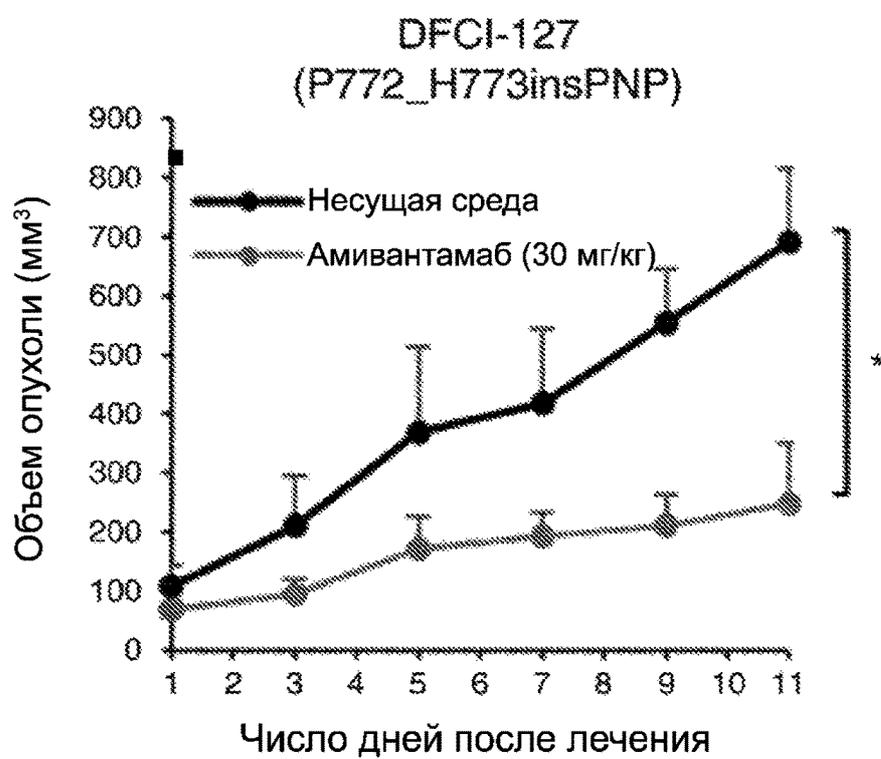
Фиг. 4Б



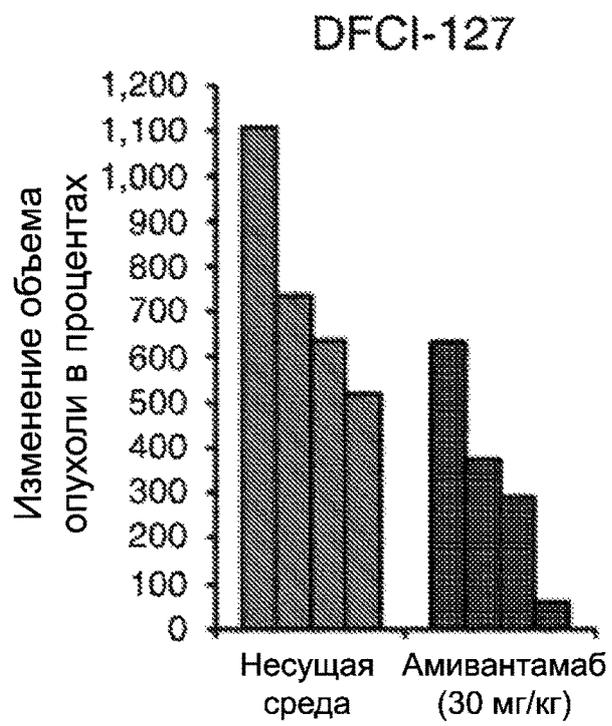
Фиг. 4В



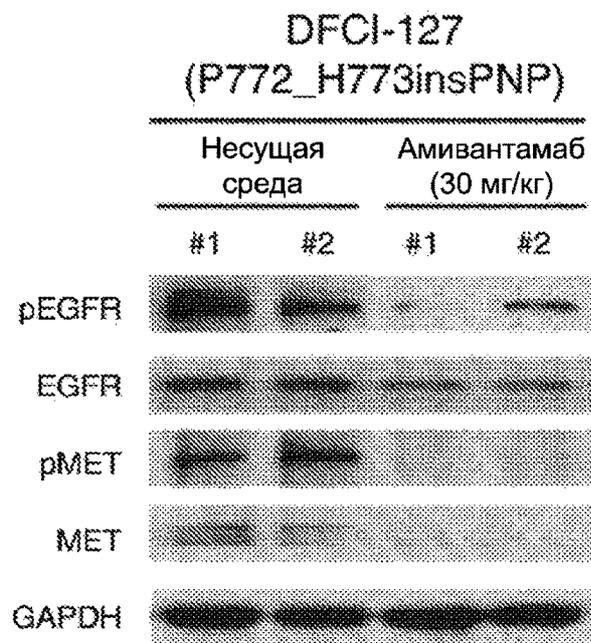
Фиг. 4Г



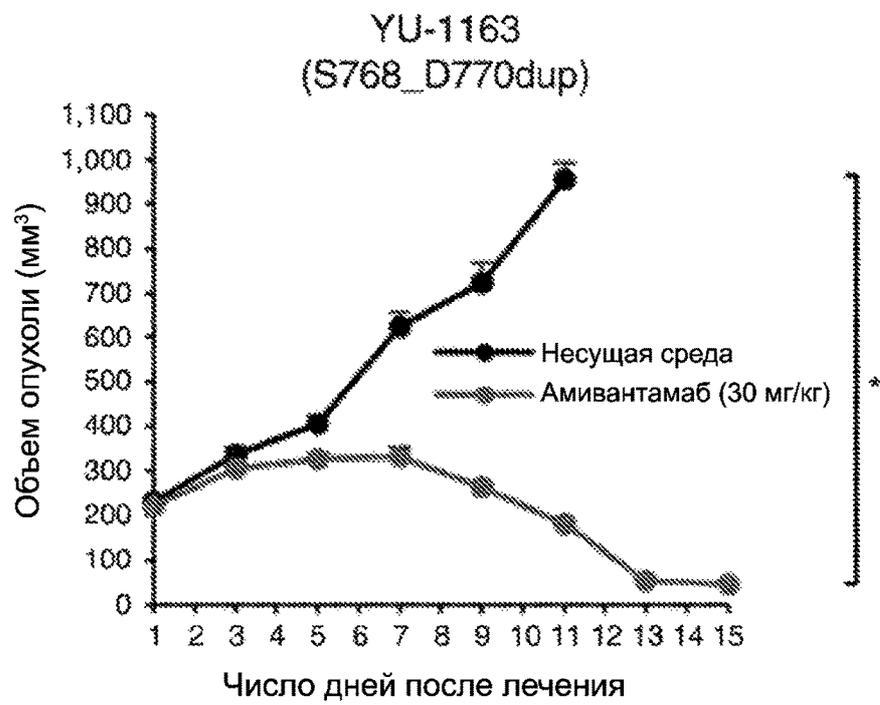
Фиг. 4Д



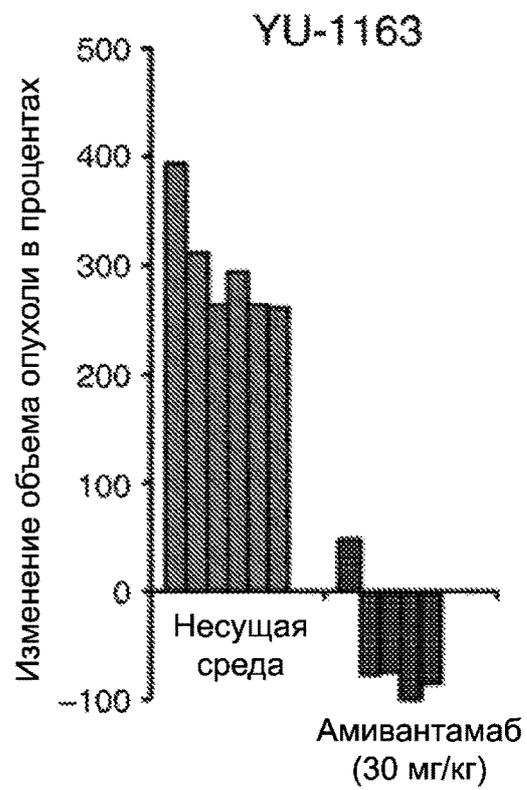
Фиг. 1Е



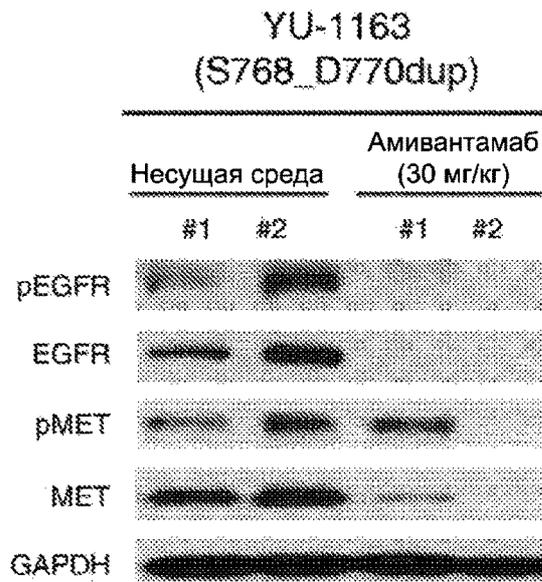
Фиг. 4Ж



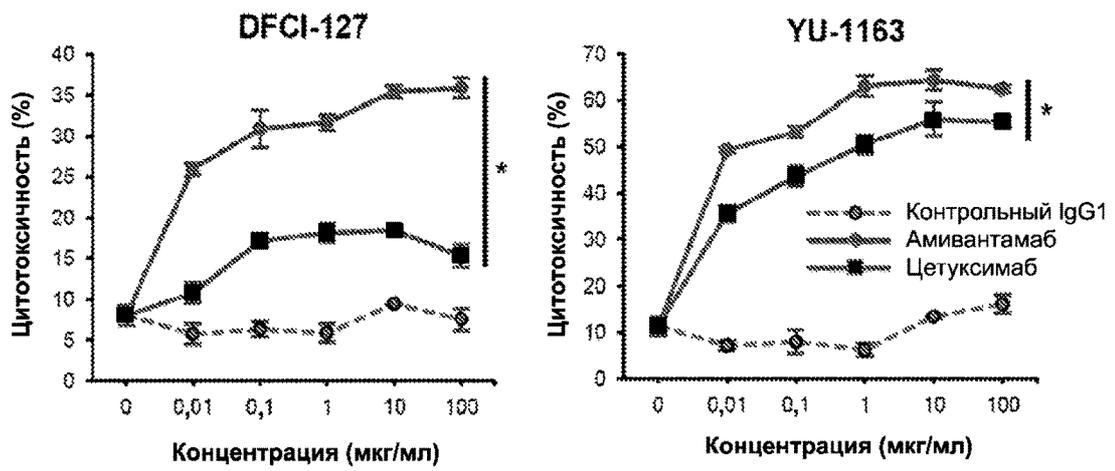
Фиг. 43



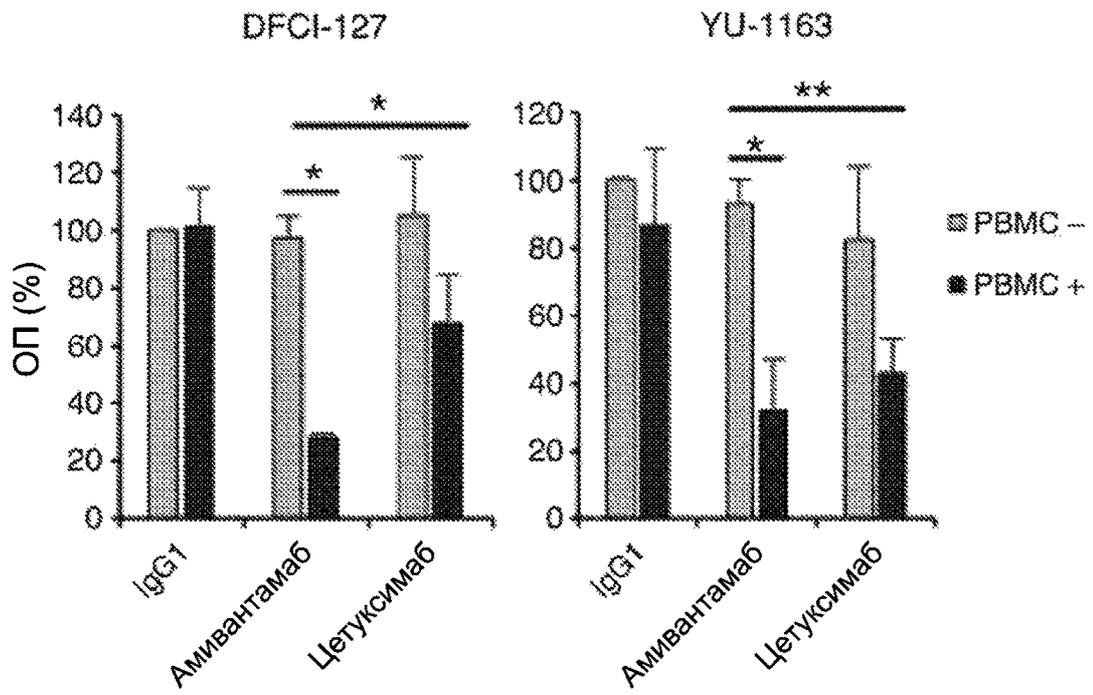
Фиг. 4И



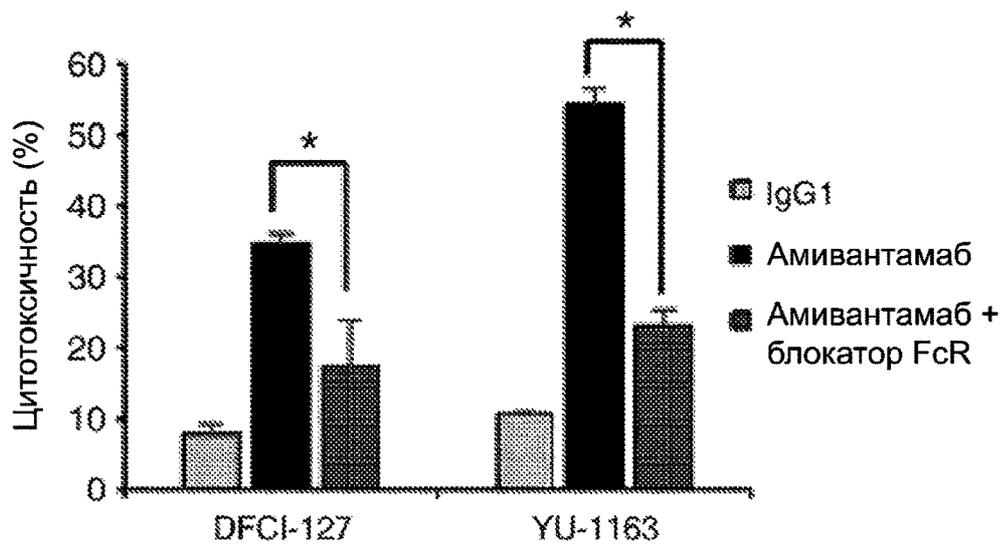
Фиг. 5А



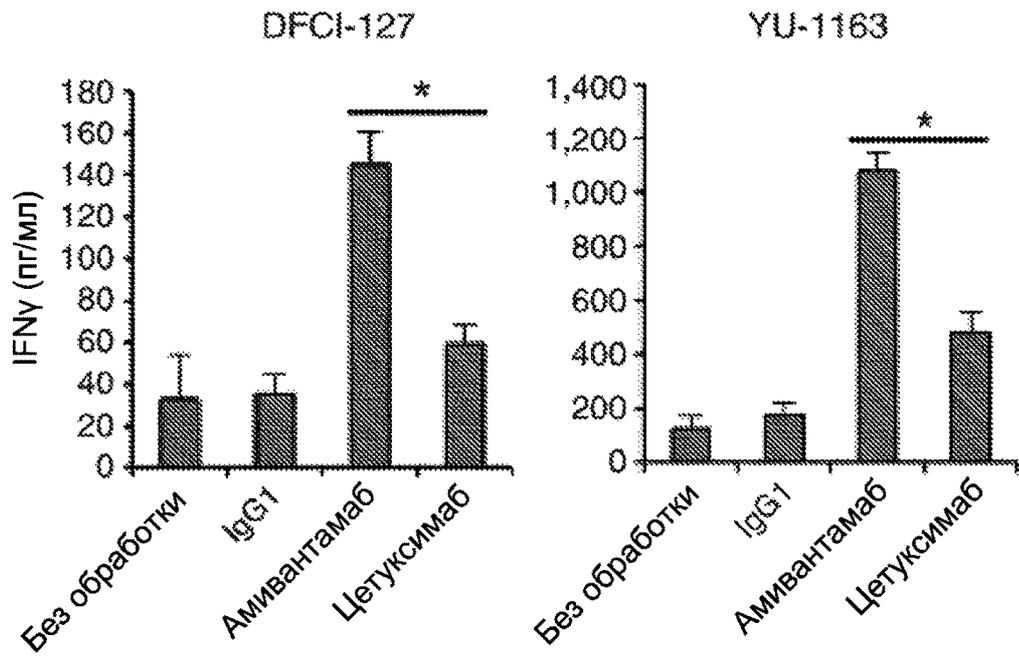
Фиг. 5Б



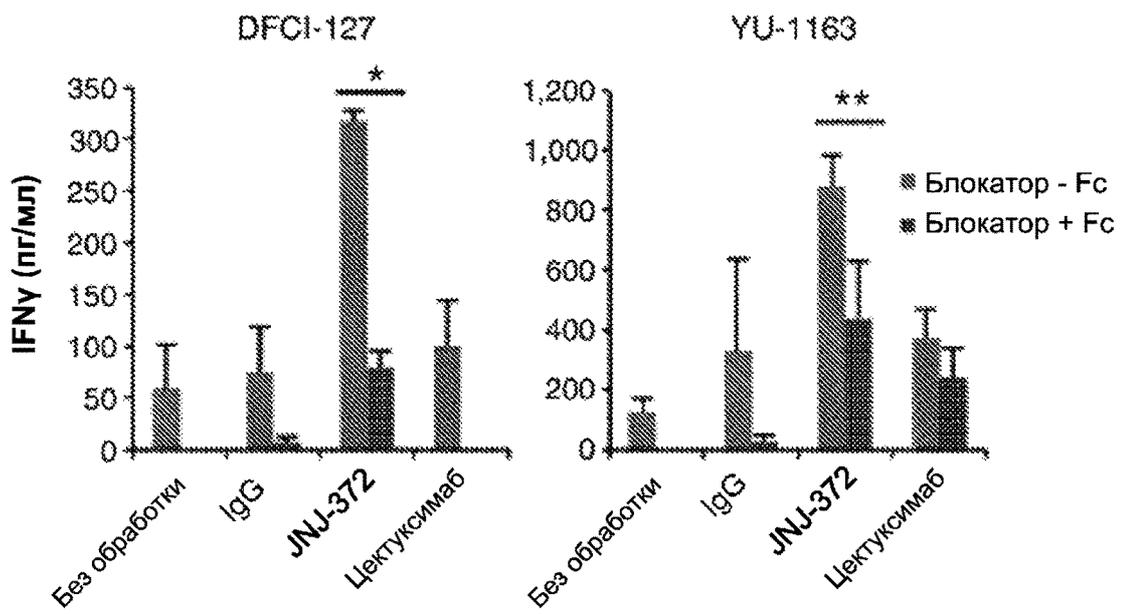
Фиг. 5В



Фиг. 5Г



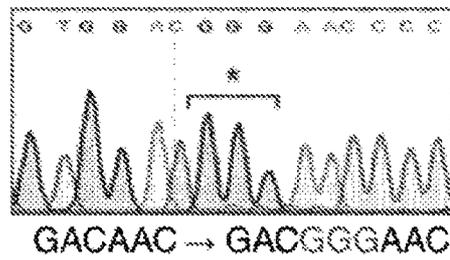
Фиг. 5Д



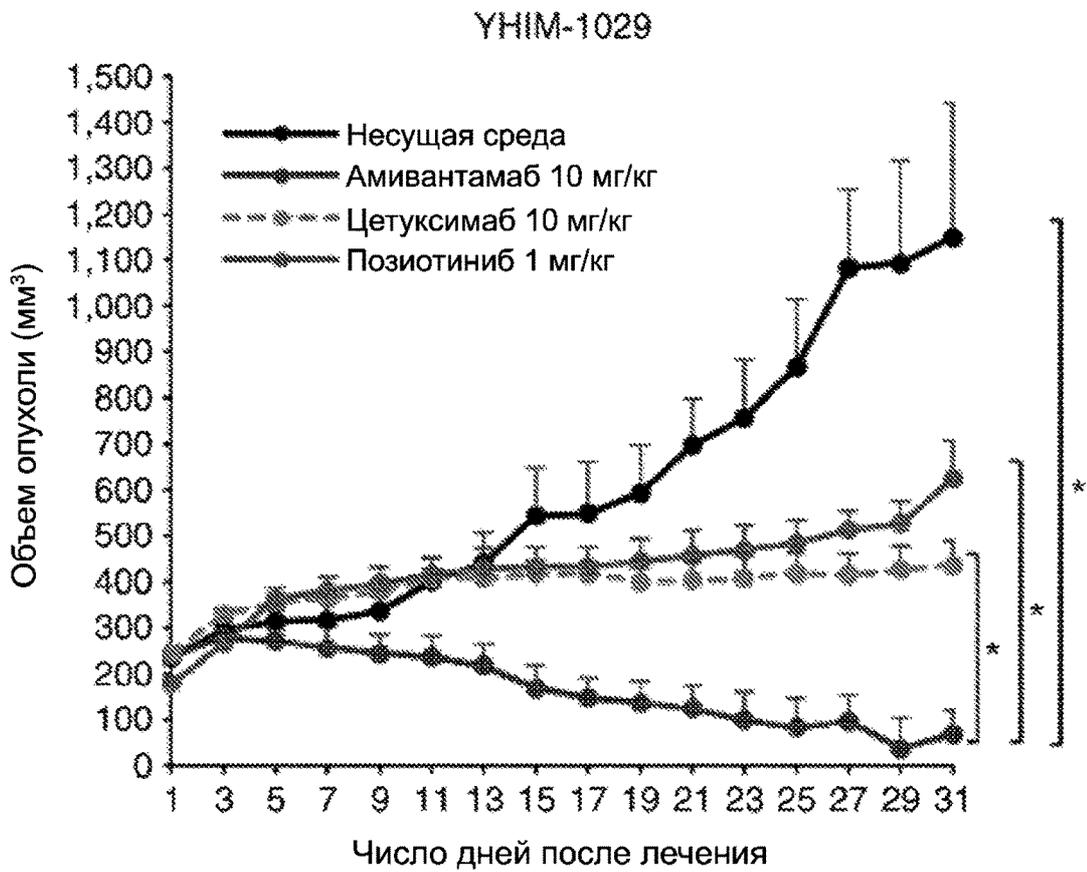
Фиг. 6А

YHIM-1029 (D770\_N771insG)

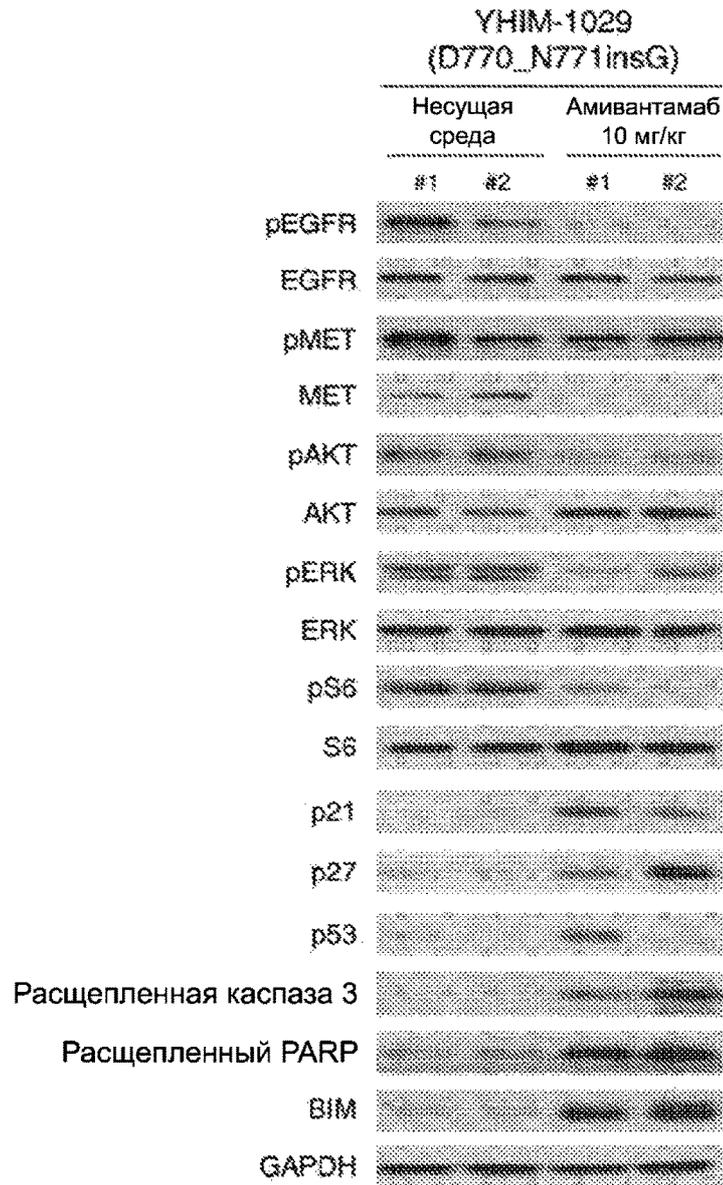
D770\_N771insG



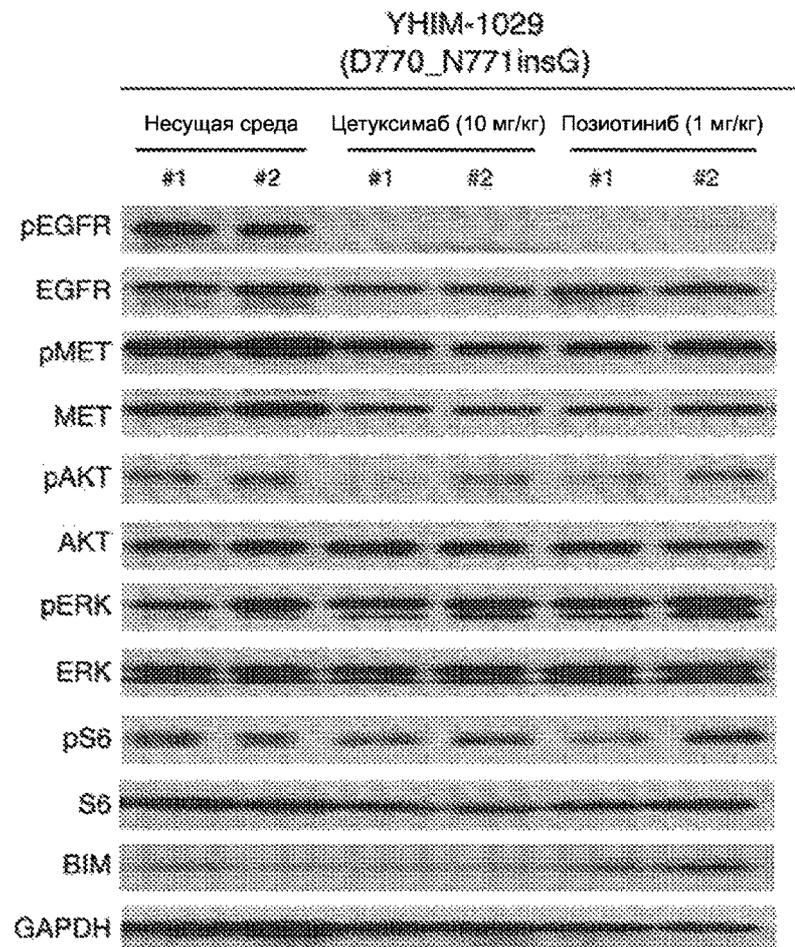
Фиг. 6Б



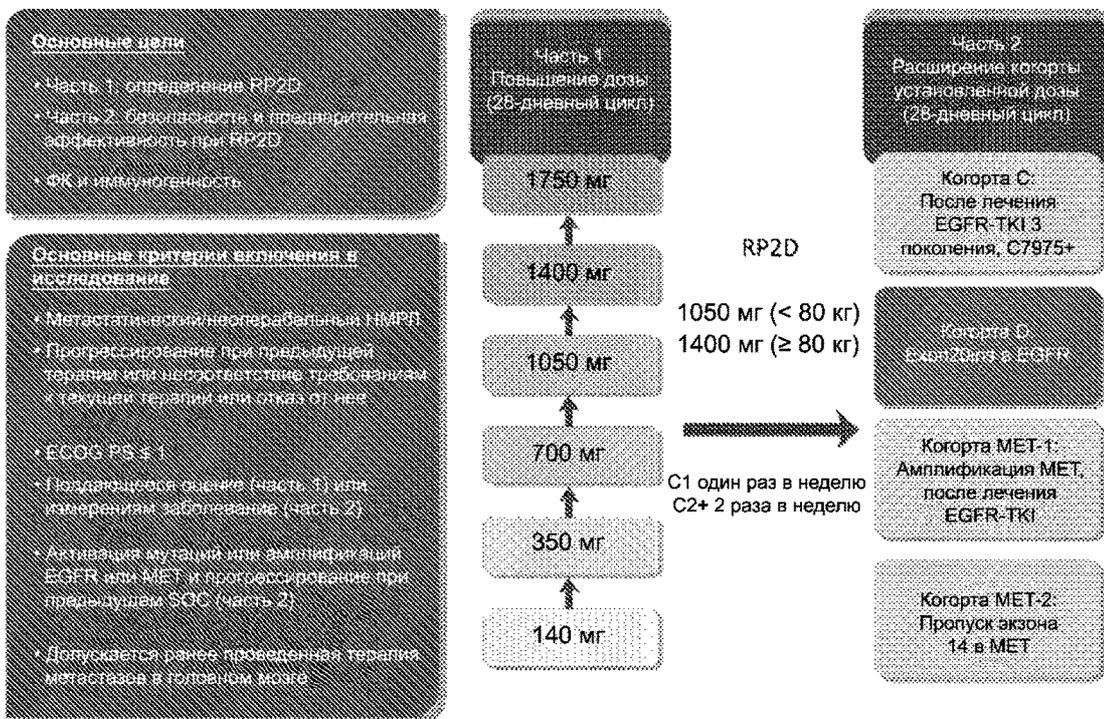
Фиг. 6В



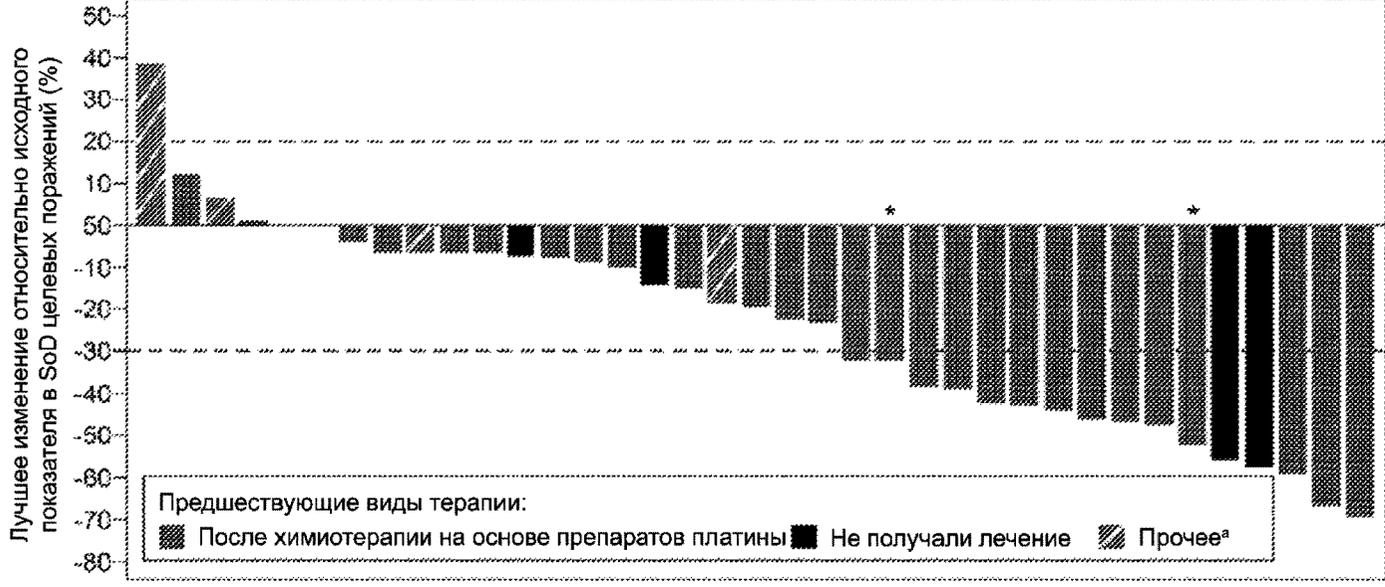
Фиг. 6Г



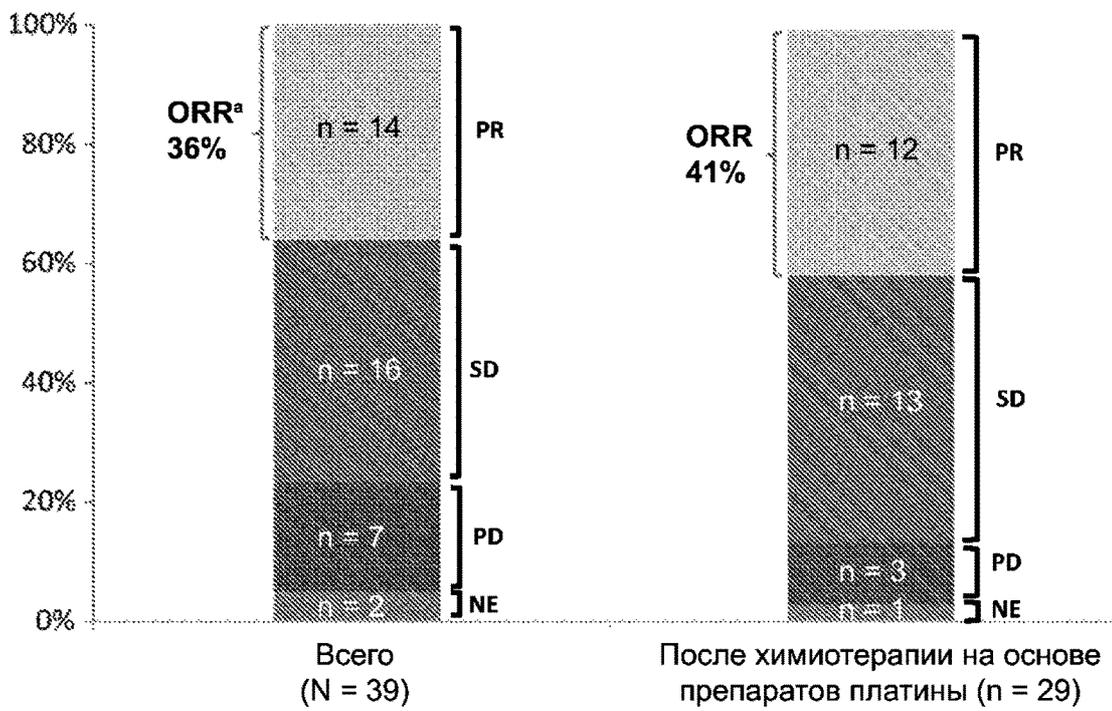
Фиг. 7



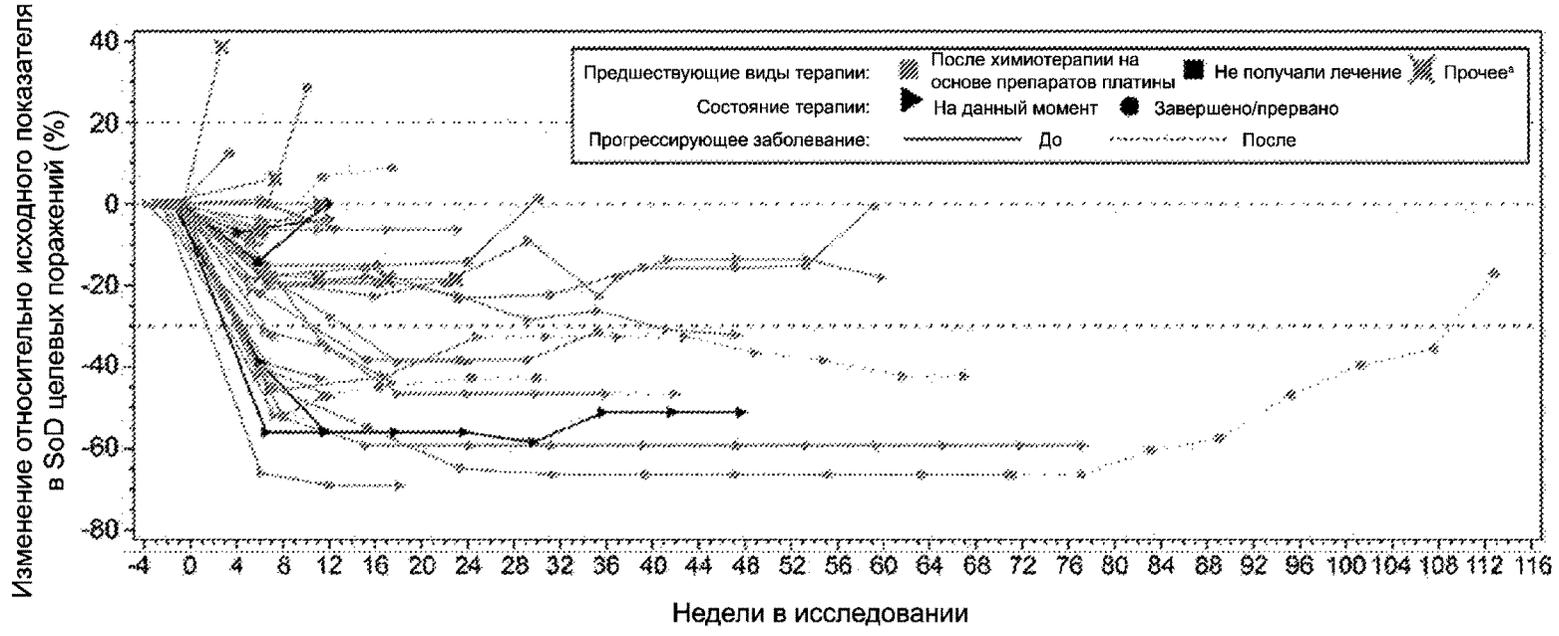
Фиг. 8



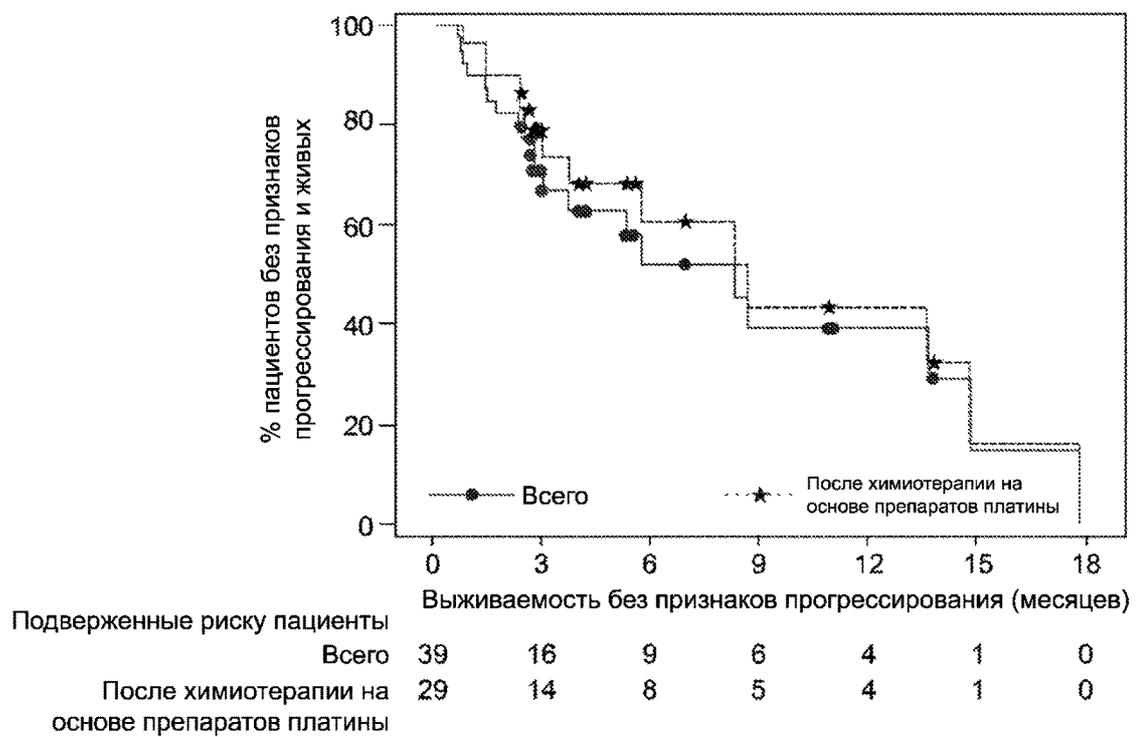
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11







Фиг. 12В

