

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391504** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.24

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

(22) Дата подачи заявки
2021.12.15

(54) **ЛЕЧЕНИЕ РАКА С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛА, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТ LGR5 И рЭФР**

(31) 2027118

(72) Изобретатель:

(32) 2020.12.15

Сирульник Леонардо Андрес,
Вассерман Эрнесто Айзек (NL)

(33) NL

(86) PCT/NL2021/050763

(74) Представитель:

(87) WO 2022/131912 2022.06.23

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

МЕРУС Н.В. (NL)

(57) Настоящее изобретение относится к средствам и способам для лечения рака. Настоящее изобретение, в частности, относится к способу лечения рака у индивидуума с помощью антитела, которое связывает LGR5 и рЭФР. Настоящее изобретение также относится к комбинации для применения в таких способах и к комбинации для применения в изготовлении медикамента для лечения рака головы и шеи.

A1

202391504

202391504

A1

ЛЕЧЕНИЕ РАКА С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛА, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТ LGR5 И рЭФР

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к средствам и способам для лечения рака. Настоящее изобретение в частности, относится к способу лечения рака у индивидуума с помощью антитела, которое связывает LGR5 и рЭФР. Настоящее изобретение также относится к комбинации для применения в таких способах и к комбинации для применения в изготовлении медикамента для лечения рака головы и шеи. Такие антитела подходят, в частности, для лечения рака головы и шеи.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Традиционно, в большинстве случаев поиск новых лекарственных средств для лечения рака был сосредоточен на агентах, блокирующих важнейшие функции клеток и убивающих делящиеся клетки посредством химиотерапии. Однако химиотерапия редко приводит к полному излечению. В большинстве случаев опухоли у пациентов прекращают рост или временно уменьшаются в размерах (так называемая ремиссия), а затем все равно повторно начинают пролиферировать, иногда с большей скоростью (так называемый рецидив), и все труднее поддаются лечению. В последнее время при разработке лекарственных средств от рака внимание сместилось от цитотоксической химиотерапии широкого действия в сторону вариантов направленной цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение распространенного рака с применением направленной терапии, специфично ингибирующей компоненты сигнальных путей, прошло валидацию в клинике для лейкоза. Однако для большинства карцином направленные способы по-прежнему оказываются неэффективными.

Рак по-прежнему является одной из основных общемировых причин смерти, несмотря на многочисленные успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, и рост знаний о молекулярных явлениях, которые приводят к раку. Сообщалось, что в США рак головы и шеи, в частности, рак полости рта и глотки, уже составляет 3% злокачественных новообразований, при этом ежегодно приблизительно у 53 000 американцев развивается такой рак и 10 800 человек от него умирают (Siegel et al., CA Cancer J Clin. 2020;70(1):7. Epub 2020 Jan 8.). Кроме того, сообщается, что плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ) является шестым по частоте встречаемости видом рака в мире, и пятилетний общий уровень выживаемости пациентов с ПКГШ составляет приблизительно 40–50% (при раке головы и шеи, Международный союз по борьбе с раком, Обзор противораковых медикаментов за 2014 г., Перечень основных лекарственных средств ВОЗ).

Метаанализ местно-распространенной плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ЛР-ПКГШ) показал, что добавление агента против рЭФР к радиационной терапии или хеморадиационной терапии не улучшало клинические исходы у пациентов с ЛР-ПКГШ (Oncotarget. 2017; 8(60):102371-102380). Также сообщалось, что добавление агентов против рЭФР повышает риск токсичности для кожи и мукозита.

Соответственно, существует потребность в улучшенных или альтернативных способах лечения рака, в частности, лечения рака головы и шеи.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Согласно настоящему изобретению предложены описанные ниже предпочтительные аспекты и варианты реализации. Однако настоящее изобретение не ограничено только ими.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака у субъекта, причем указанное применение включает 10 обеспечение указанного субъекта фиксированной дозой 1500 мг указанного антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. Рак, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой рак головы и шеи.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения рака головы и шеи включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5. 15

Также предложено применение антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которое содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, в изготовлении 20 медикамента для лечения рака головы и шеи, причем указанное применение включает обеспечение субъекта или введение субъекту фиксированной дозы 1500 мг указанного антитела или его функциональной части, производного и/или аналога.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5 для применения в лечении рака головы и шеи у субъекта. Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения рака головы и шеи у субъекта, включающие 25 обеспечение нуждающегося в этом субъекта антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом. Предпочтительно, указанное применение включает обеспечение указанного субъекта фиксированной дозой 1500 мг указанного антитела или его функциональной части, производного и/или аналога. 30

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

Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в одном или более генах сигнального пути рЭФР, более предпочтительно в HRAS, MAP2K1 и/или PLCG2. Более предпочтительно мутация присутствует в гене, продукт экспрессии которого активен в сигнальном пути рЭФР на следующих после рЭФР этапах, наиболее предпочтительно в гене HRAS.

Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в одном или более генах сигнального пути WNT, более предпочтительно в APC, CREPPB, CUL1, EP300, SOX17 и/или TP53.

Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в гене, выбранном из генов AKT1, KRAS, MAP2K1, NRAS, HRAS, PIK3CA, PTEN и рЭФР. Более предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в гене, кодирующем TP53, PIK3CA, CDKN2A, NOTCH1, HRAS и/или MAP2K1. Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в одном или более генах, приведенных в таблице 1. Предпочтительно, указанный рак имеет один или более из мутаций, приведенных в таблице 1.

В частности, указанный рак представляет собой рак головы и шеи, более конкретно, плоскоклеточную карциному или аденокарциному, наиболее конкретно – плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ). В частности, указанный рак головы и шеи может возникать в глотке. В глотку входят носоглотка, ротоглотка, гортаноглотка. В частности, указанный рак головы и шеи может возникать в гортани. В частности, указанный рак головы и шеи может возникать в околоносовых пазухах и носовой полости. В частности, указанный рак головы и шеи может возникать в слюнных железах. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный рак представляет собой ПКГШ ротоглотки.

Соответственно, указанный рак головы и шеи, в частности, включает аденокарциному, однако более предпочтительно представляет собой плоскоклеточные карциномы головы и шеи, такие как рак носоглотки, рак гортани, гипофарингеальный рак, рак носовой полости, рак околоносовых пазух, рак полости рта, рак ротоглотки и рак слюнной железы.

Предпочтительно, указанный рак экспрессирует рЭФР и/или экспрессирует LGR5. В настоящем документе подразумевается, что рак экспрессирует LGR5, если указанный рак содержит клетки, которые экспрессируют LGR5. Клетка, которая экспрессирует LGR5, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующей LGR5. В настоящем документе подразумевается, что рак экспрессирует рЭФР, если указанный рак содержит клетки, которые экспрессируют рЭФР. Клетка, которая экспрессирует рЭФР, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующей рЭФР. Экспрессия также может быть детектирована путем инкубирования клетки с антителом, которое связывается с LGR5 или рЭФР, и детекции с применением иммуногистохимического исследования против любого одного из антигенов или против обоих антигенов.

Предпочтительно, указанный раг экспрессирует LGR5 на достаточных уровнях для связывания с белком LGR5 антитела, в частности, антитела, содержащего VH-цепь переменного домена, связывающего LGR5, который включает последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанную на фиг. 3, или альтернативные переменные домены, которые связывают LGR5, описанные в настоящем документе. Предпочтительно, указанный раг экспрессирует рЭФР на достаточных уровнях для связывания с белком рЭФР антитела, в частности, антитела, содержащего VH-цепь переменного домена, связывающего рЭФР, который включает последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанную на фиг. 3, или альтернативные переменные домены, которые связывают рЭФР, описанные в настоящем документе.

Предпочтительно, VH-цепь переменного домена, который связывает рЭФР, содержит последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанную на фиг. 3; или последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанную на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, включая инсерции, делеции, замены или комбинацию перечисленных модификаций относительно указанной VH; при этом VH-цепь переменного домена, который связывает LGR5, содержит последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанную на фиг. 3; или последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанную на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, включая инсерции, делеции, замены или комбинацию перечисленных модификаций относительно указанной VH.

Предпочтительно, переменный домен, который связывает LGR5, связывает эпителий, локализованный в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности LGR5 человека, показанной на фиг. 1. Предпочтительно, остатки аминокислот в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 LGR5 человека вовлечены в связывание связывающего LGR5 переменного домена с LGR5. Предпочтительно, связывающий LGR5 переменный домен в меньшей степени связывается с белком LGR5, содержащим один или более вариантов остатков аминокислот, выбранных из 43A, 44A, 46A, 67A, 90A и 91A.

Предпочтительно, переменный домен, который связывает рЭФР, связывает эпителий, локализованный в пределах остатков аминокислот 420–480 последовательности рЭФР человека, показанной на фиг. 2. Предпочтительно, остатки аминокислот в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 рЭФР человека вовлечены в связывание связывающего рЭФР переменного домена с рЭФР. Предпочтительно, указанный связывающий рЭФР переменный домен в меньшей степени связывается с белком рЭФР, содержащим один или более вариантов замен остатков аминокислот, выбранных из I462A, G465A, K489A, I491A, N493A и C499A.

Предпочтительно, антитело представляет собой антитело с усиленной АЗКЦ-активностью. Предпочтительно, указанное антитело является афукозилированным. Предпочтительно, субъект, которому вводят антитело согласно настоящему описанию, имеет иммунную систему, которая позволяет задействовать Fc-область антитела согласно настоящему изобретению. Более предпочтительно, у указанного субъекта имеются FcγRIIIa (CD16+) и/или FcγRIIa (CD32+) иммунные эффекторные клетки, чтобы задействовать Fc-область антитела согласно настоящему изобретению. Указанные иммунные эффекторные клетки предпочтительно представляют собой естественные клетки-киллеры (NK-клетки), макрофаги или нейтрофилы, содержащие указанные Fc-рецепторы.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1. Последовательность LGR5 человека; последовательность ID NO: 1.

Фиг. 2. Последовательность рЭФР человека; последовательность ID NO: 2.

Фиг. 3 а). Последовательности аминокислот переменных областей тяжелых цепей (последовательности Seq ID No: 3–15), которые совместно с переменной областью общей легкой цепи, такой как переменная область легкой цепи каппа человека IgVκ1 39*01/IGJκ1*01, образуют переменный домен, который связывает LGR5 и рЭФР. CDR и каркасные области представлены на фиг. 3b. Соответствующие последовательности ДНК представлены на фиг. 3с.

Фиг. 4 а). Последовательность аминокислот общей легкой цепи. б) Последовательность ДНК переменной области общей легкой цепи и транскрибированная последовательность (IGKV1-39/jk1). с) Последовательность ДНК константной области легкой цепи и транскрибированная последовательность. d) V-область IGKV1-39A; e) CDR1, CDR2 и CDR3 общей легкой цепи в соответствии с нумерацией IMGT.

Фиг. 5. Тяжелые цепи IgG для получения биспецифических молекул. а) Последовательность ДНК и транскрибированная последовательность CH1-области. б) Шарнирная область последовательность ДНК и транскрибированная последовательность. с) Последовательность ДНК и транскрибированная последовательность CH2-области. d) Последовательность ДНК и транскрибированная последовательность домена CH3, содержащего варианты L351K и T366K (KK). e) Последовательность ДНК и транскрибированная последовательность домена CH3, содержащего варианты L351D и L368E (DE). Положения остатков соответствуют нумерации EU.

Фиг. 6. Данные, показывающие средний объем опухоли в шести PDX-моделях рака головы и шеи у контроля и при лечении с помощью антитела, нацеленного на рЭФР и LGR5, с релевантными планками погрешностей на основе двустороннего тестирования. Дозирование и антителом, и контролем проводили один раз в неделю на протяжении шести недель, соответствующих зонам серого цвета.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для более легкого понимания настоящего описания сначала будут определены некоторые термины. Дополнительные определения приведены в тексте подробного описания. За исключением случаев, когда определение приведено отдельно в настоящем документе, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, соответствующие общеизвестному специалистам в соответствующей области техники, и используются стандартные методы иммунологии, химии белков, биохимии, методики рекомбинантной ДНК и фармакологии.

В настоящем документе термины в единственном числе включают соответствующие термины во множественном числе. Использование термина «содержащий», «имеющий», «включающий», а также других форм, таких как «содержать», «содержит», «содержащийся», «имеет», «имеют», «имел(и)», «включают», «включает» и «включенный», является неограничивающим.

Термин «антитело» в настоящем документе означает белковую молекулу, принадлежащую к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более доменов, которые связывают эпитоп на антигене, причем такие домены представляют собой переменную область антитела, или происходят из нее, или характеризуются гомологией последовательностей в отношении переменной области антитела. Антитела, как правило, состоят из основных структурных единиц, каждое имеет две тяжелых цепи и две легких цепи. Антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным форматом или способом его получения.

«Биспецифическое антитело» представляет собой антитело согласно описанию в настоящем документе, отличающееся тем, что один домен указанного антитела связывается с первым антигеном, тогда как второй домен антитела связывается с вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены не идентичны, или тем, что один домен связывает первый эпитоп на антигене, тогда как второй домен связывается с вторым эпитопом на указанном антигене. Термин «биспецифическое антитело» также включает антитела, отличающиеся тем, что одна комбинация переменной области тяжелой цепи/ переменной области легкой цепи (VH/VL) связывает первый антиген или эпитоп на антигене, а вторая комбинация VH/VL связывает второй антиген или эпитоп на антигене. Термин также включает антитела, отличающиеся тем, что VH способен специфически распознавать первый антиген, а VL, спаренный с VH в переменной области иммуноглобулина, способен специфически распознавать второй антиген. Полученная пара VH/VL связывает или антиген 1, или антиген 2. Такие так называемые «антитела типа “два в одном”», описанные, например, в источниках: WO 2008/027236, WO 2010/108127 и Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472-486, October 2011). Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения.

Термин «общая легкая цепь» в настоящем документе относится к двум легким цепям (или их VL-части) в биспецифическом антителе. Указанные две легких цепи (или их VL-часть) могут быть идентичными или иметь какие-то различия в последовательностях аминокислот, при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не нарушается. Термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одиночная легкая цепь», «одиночная VL», с добавлением или без добавления термина «реаранжированная» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. «Общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, последовательность аминокислот которых не идентична. Может существовать множество вариантов указанной легкой цепи, отличающихся тем, что в них присутствуют мутации (делеции, замены, инсерции и/или добавления), не влияющие на образование функциональных связывающих областей. Легкая цепь согласно настоящему изобретению может также представлять собой легкую цепь согласно описанию в настоящем документе, имеющую 0–10, предпочтительно 0–5 инсерций, делеций, замен, добавлений аминокислот или комбинацию перечисленного. Например, в определение общих легких цепей в настоящем документе, входит получение или обнаружение легких цепей, которые не идентичны, однако, тем не менее, функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных изменений аминокислот, изменений аминокислот в областях, которые не вносят вклада или только частично вносят вклад в специфичность связывания при спаривании с тяжелой цепью, и т.п.

В настоящем документе термин «содержать» и все его грамматические формы используют в неограничивающем смысле для обозначения того, что следующие за этим термином объекты включены, однако объекты, конкретным образом не упомянутые, не исключены. Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен на выражение «состоять по существу из», означающее, что соединение или вспомогательное соединение согласно определению в настоящем документе может содержать дополнительные компонент (или компоненты), помимо конкретно идентифицированных, при этом указанный дополнительный компонент (или компоненты) не изменяют уникальную характеристику согласно настоящему изобретению.

Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с настоящим изобретением определен как содержащий по существу полный IgG, который, тем не менее, не обязательно имеет все функции интактного IgG. Во избежание разночтений уточним, что полноразмерный IgG содержит две тяжелых и две легких цепи. Каждая цепь содержит константные (C) и переменные (V) области, которые могут быть разбиты на домены, называемые CH1, CH2, CH3, VH, и CL, VL. IgG-антитело связывается с антигеном за счет доменов переменной области, которые содержатся в Fab-части, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы через константные домены, в основном через Fc-часть. Полноразмерные антитела в соответствии с настоящим изобретением охватывают молекулы IgG, причем могут присутствовать варианты, которые обеспечивают требуемые характеристики.

Полноразмерный IgG не должен иметь делеции в значимых частях каких-либо из областей. Однако молекулы IgG, отличающиеся тем, что один или несколько остатков аминокислот делетированы, по существу без изменений связывающих характеристик итоговой молекулы IgG, включены в термин «полноразмерный IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию 1–10 остатков аминокислот, предпочтительно в не являющихся CDR областях, при этом делетированные аминокислоты не имеют существенного значения для антигенсвязывающей специфичности IgG.

«Производное антитела» представляет собой белок, который, за исключением CDR-областей, отличается от последовательности аминокислот естественного антитела самое большее 20 аминокислотами. Производное антитела согласно описанию в настоящем документе представляет собой антитело, которое отличается от указанной последовательности аминокислот самое большее 20 аминокислотами.

«Процент (%) идентичности» применительно к последовательностям нуклеиновых кислот или аминокислот в настоящем документе определен как процент остатков в кандидатной последовательности, идентичных остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей для оптимального сравнения. Процент идентичности последовательностей при сравнении последовательностей нуклеиновых кислот определяют с помощью приложения AlignX из программного обеспечения Vector NTI Advance[®] 11.5.2, используя параметры, установленные по умолчанию, где используются модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J., (1994) Nuc. Acid Res. 22(22): 4673-4680), оценочная матрица «swgapdnamt», штраф за введение пропуска = 15 и штраф за продление пропуска = 6,66. Последовательности аминокислот выравнивают с помощью приложения AlignX из программного обеспечения Vector NTI Advance[®] 11.5.2, используя параметры, установленные по умолчанию, где используются модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J., (1994) Nuc. Acid Res. 22(22): 4673-4680), оценочная матрица «blosum62mt2», штраф за введение пропуска = 10 и штраф за продление пропуска = 0,1.

Поскольку антитело, как правило, распознает эпитоп антигена, и такой эпитоп может присутствовать также в других соединениях, антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые «специфически распознают» антиген, например, рЭФР или LGR5, могут распознавать и другие соединения, если такие другие соединения содержат эпитоп того же вида. Поэтому термины «специфически распознает» применительно к взаимодействию антигена и антитела не исключает связывания антител с другими соединениями, которые содержат эпитоп того же вида.

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене, с которым иммуноглобулин или антитело специфически связывается. Эпитопы могут быть образованы как непрерывно расположенными аминокислотами, так и прерывисто расположенными

аминокислотами, сближающимися за счет третичной укладки белка (так называемые линейные и конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные непрерывно расположенными линейными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, как правило, утрачивают конформацию при
5 обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп может включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и т.п. (например, пациент, такой как пациент-
10 человек, имеющий рак). Предпочтительно, субъект представляет собой субъекта-человека.

Термины «лечить» и «лечение» в настоящем документе относятся в любому типу осуществляемого у субъекта вмешательства или процесса, или введение активного агента или комбинации активных агентов субъекту с целью обращения, смягчения, облегчения, ингибирования или замедления, или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома,
15 осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием.

В настоящем документе «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, дающему благоприятный эффект, например, облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства, например, рака. Благоприятный эффект может принимать форму улучшения относительно исходного состояния, в том числе улучшения
20 относительно измерения или наблюдения, сделанных до начала терапии в соответствии со способом. Например, благоприятный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или обращения прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, о чем свидетельствует уменьшение или элиминация клинического или диагностического симптома заболевания, или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшать размер опухоли,
25 снижать присутствие циркулирующих опухолевых клеток, уменьшать или предотвращать метастазы опухоли, замедлять или останавливать рост опухоли и/или предотвращать или задерживать возвращение или рецидив опухоли.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента или комбинации агентов, которое обеспечивает требуемый
30 биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этот результат может представлять собой снижение, облегчение, паллиативное облегчение, смягчение, задержку и/или облегчение одного или более из признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое требуемое изменение биологической системы. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития

опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива опухоли. Эффективное количество может быть введено за одно введение или более. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) снижать количество раковых клеток; (ii) 5 снижать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, в некоторой степени замедлять, и может останавливать инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; (iv) ингибировать метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) облегчать в некоторой степени один или более симптомов, ассоциированных с раком. Согласно одному примеру «эффективное количество» 10 представляет собой количество антитела к рЭФР/LGR5, которое влияет на уменьшение рака (например, уменьшение числа раковых клеток); замедление прогрессирования рака или предотвращение повторного роста или рецидива рака.

Термин «фиксированная доза» в настоящем документе относится к режиму дозирования, при котором субъекту вводят фиксированное количество терапевтического вещества за несколько 15 введений, независимо от массы тела субъекта. Фиксированное дозирование, как правило, сокращенно обозначают как «qnw», где n представляет собой целое число, обозначающее интервал, и w обозначает неделю. Например, схема введения q2w фиксированной дозы 1500 мг антитела означает, что фиксированное количество антитела 1500 мг вводят каждые 2 недели. В данном случае, терапевтическое вещество предпочтительно представляет собой антитело, связывающее 20 рЭФР и LGR5, которое вводят в рамках режима дозирования 1500 мг q2w.

Перед введением фиксированной дозы может проводиться премедикация, что означает, что до введения антитела согласно настоящему изобретению субъекту вводят медикамент. Предпочтительно, перед введением фиксированной дозы 1500 мг антитела проводят премедикацию антигистаминными средствами, снижающим болевой синдром медикаментом, жаропонижающим 25 медикаментом и/или противовоспалительным медикаментом.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака. В настоящем документе используются термины «рак» 30 и «опухоль» и, как правило, оба они относятся к раку, если иное конкретным образом не указано.

Рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР) (рЭФР, ErbB1 или HER1) представляет собой член семейства четырех рецепторных тирозинкиназ (РТК), называемых Her- или cErbB-1, -2, -3 и -4. рЭФР известен под различными синонимичными названиями, наиболее распространенным из которых является рЭФР. рЭФР имеет внеклеточный домен (ВКД), который состоит из четырех

субдоменов, два из которых вовлечены в связывание лиганда, и два вовлечены в гомодимеризацию и гетеродимеризацию. рЭФР интегрирует внеклеточные сигналы от различных лигандов с получением разнообразных внутриклеточных ответов. Основной путь передачи сигнала, активируемый рЭФР, состоит из митогенного сигнального каскада Ras/митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Активация указанного пути начинается с привлечения Grb2 к тирозин-фосфорилированному рЭФР. Это приводит к активации Ras через связанный с Grb2 фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Ras Son of Sevenless (SOS). Кроме того, рЭФР также активирует путь передачи сигнала PI3-киназы-Akt, хотя указанная активация значительно сильнее в случае коэкспрессии ErbB-3 (HER3). рЭФР вовлечен в некоторые эпителиальные злокачественные новообразования человека, в частности, рак молочной железы, мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак ободочной кишки, рак яичника и рак головного мозга. Обнаружены активирующие мутации в его гене, а также избыточная экспрессия рецептора и его лигандов, приводящие к возникновению петель аутокринной активации. Указанная РТК, соответственно, широко используется в качестве мишени для терапии рака. Были разработаны низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на РТК, так и моноклональные антитела (mAb), направленные на внеклеточные лиганд-связывающие домены, и в ряде случаев они показали клиническую успешность, хотя в основном для узкой группы пациентов. Номер доступа в базе данных белка рЭФР человека и кодирующего его гена – GenBank NM_005228.3. Указанный номер доступа в первую очередь приведен в качестве дополнительного способа идентификации белка рЭФР как мишени, фактическая последовательность белка рЭФР, связываемого антителом, может варьировать, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как мутации, возникающие при некоторых видах рака, или т.п.

Если в настоящем документе упоминается рЭФР, имеется в виду рЭФР человека, если не указано иное. Антигенсвязывающий сайт варибельного домена, который связывает рЭФР, связывает рЭФР и различные варианты рЭФР, такие как экспрессируемые на некоторых положительных по рЭФР опухолях.

Термин «LGR» относится к семейству белков, известному как содержащие богатые лейцином повторы сопряженные с G-белком рецепторы. Несколько членов этого семейства, как известно, вовлечены в сигнальный путь WNT, из них стоит отметить LGR4; LGR5 и LGR6.

LGR5 представляет собой содержащий богатые лейцином повторы сопряженный с G-белком рецептор 5. Альтернативные названия указанного гена или белка включают содержащий богатые лейцином повторы сопряженный с G-белком рецептор 5; сопряженный с G-белком содержащий богатые лейцином повторы рецептор 5; сопряженный с G-белком рецептор HG38; сопряженный с G-белком рецептор 49; сопряженный с G-белком рецептор 67; GPR67; GPR49; орфанный сопряженный с G-белком рецептор HG38; рецептор 49, сопряженный с G-белком;

GPR49; HG38 и FEX. Белок или антитело согласно настоящему изобретению, который (которое) связывает LGR5, связывает LGR5 человека. Связывающий LGR5 белок или связывающее LGR5 антитело согласно настоящему изобретению может, за счет сходства последовательности и третичной структуры ортологов человека и других млекопитающих, также связывать такой ортолог, но не обязательно. Номера доступа в базе данных белка LGR5 человека и кодирующего его гена – (NC_000012.12; NT_029419.13; NC_018923.2; NP_001264155.1; NP_001264156.1; NP_003658.1). Указанные номера доступа приведены в первую очередь в качестве дополнительного способа идентификации LGR5 как мишени, фактическая последовательность связанного белка LGR5 может варьировать, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как мутации, возникающие при некоторых видах рака или т.п. Сайт связывания антигена LGR5 связывает LGR5 и различные варианты LGR5, такие как экспрессируемые некоторыми положительными по LGR5 опухолевыми клетками.

Рак, известный под общим названием «рак головы и шеи», обычно начинается в плоских клетках, выстилающих поверхности влажных слизистых оболочек внутри головы и шеи, например, в полости рта, носа и горла. Указанный рак плоских клеток часто называют плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Рак головы и шеи может также, хотя и редко, возникать в слюнных железах. В частности, рак головы и шеи может возникать в ротовой полости. Сюда входят губы, передние две трети языка, десны, внутренняя выстилка щек и губ, дно полости рта под языком, твердое небо и небольшие участки десен за зубами мудрости.

Соответственно, в частности, рак головы и шеи включает рак носоглотки, рак гортани, гипофарингиальный рак, рак носовой полости, рак околоносовых пазух, рак полости рта, рак ротоглотки или рак слюнной железы. Более конкретно, настоящее изобретение относится к лечению рака, включая плоскоклеточный рак головы и шеи, локализованный в ротоглотке.

Согласно некоторым описанным вариантам указанный рак экспрессирует LGR5 и/или рЭФР. Согласно настоящему документу рак экспрессирует LGR5, если указанный рак содержит клетки, которые экспрессируют LGR5. Клетка, которая экспрессирует LGR5, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующие LGR5. Согласно настоящему документу рак экспрессирует рЭФР, если указанный рак содержит клетки, которые экспрессируют рЭФР. Клетка, которая экспрессирует рЭФР, содержит детектируемые уровни РНК, кодирующей рЭФР. Экспрессия также часто может быть детектирована путем инкубации клетки с антителом, которое связывается с LGR5 или рЭФР. Однако некоторые клетки не экспрессируют белок на достаточно высоком уровне для такого теста с антителами. В таких случаях предпочтительнее детекция мРНК или других форм последовательности нуклеиновой кислоты. Предпочтительно детектировать экспрессию белка рЭФР и экспрессию мРНК LGR5. Предпочтительно, детекцию рЭФР и LGR5 выполняют путем окрашивания по методу тканевых матриц («Tissue MicroArray», TMA).

Экспрессию LGR5 предпочтительно определяют с применением метода гибридизации *in situ* (ISH). Соответственно, указанный рак предпочтительно является ISH-положительным по LGR5. «ISH-положительный» предпочтительно означает, что экспрессия характеризуется показателем H-score 1 или более. Экспрессию рЭФР предпочтительно определяют с применением иммуногистохимического исследования (ИНС). Соответственно, указанный рак предпочтительно является ИНС-положительным по рЭФР. Предпочтительно, указанный рак имеет показатель ИНС для рЭФР, равный 0, 1+, 2+ или 3+, более предпочтительно 1+, 2+ или 3+, даже более предпочтительно 2+ или 3+. Все указанные методики детекции и оценки показателей на основании результатов детекции с применением ТМА, ISH и ИНС хорошо известны среднему специалисту в данной области техники и, как правило, коммерчески доступны в виде стандартных наборов. Предпочтительно, показатель рЭФР определяют с применением коммерчески доступного набора для детекции рЭФР, такого как набор EGFR pharmDx™ Kit для использования в автостейнере Dako (Agilent). Количественное определение уровней мРНК с применением ISH и их выражение через показатель H-score, например, для LGR5, может быть выполнено с применением таких коммерчески доступных наборов, как набор RNAscope® от Advanced Cell Diagnostics (Хейворд, Калифорния, США), на платформе для окрашивания, такой как платформа BondRx (Leica, Вецлар, Германия). Как правило, показатель H-score в ISH варьирует в диапазоне 0–400. Как вариант, экспрессию LGR5 и рЭФР определяют с помощью РНК-секвенирования (RNAseq).

Субъект мог ранее не проходить лечение агентом против рЭФР. Более предпочтительно, субъект не проходил лечение антителом, нацеленным на рЭФР, наиболее предпочтительно субъект не проходил лечение цетуксимабом. Такой субъект также называется ранее не получавшим цетуксимаб субъектом, или ранее не получавшим антитела к рЭФР субъектом.

Также субъект мог ранее проходить лечение одной или более линиями стандартной одобренной терапии или получать стандартную медицинскую помощь. Хотя хирургическое лечение или лучевая терапия могут быть предпочтительными для большинства пациентов с заболеванием на ранней стадии или локализованным заболеванием, и могут быть рассмотрены при местно-распространенном заболевании, не у всех пациентов может быть возможным их применение, например, ввиду анатомической локализации рака. Стандартная одобренная терапия или стандартная медицинская помощь в настоящем документе предпочтительно включает лечение путем введения химиотерапевтического агента, предпочтительно одного или более из соединений на основе платины (например, цисплатина, карбоплатина), антинеопластического соединения (например, метотрексата), фторпиримидина (например, фторурацила, 5-FU, капецитабина), таксана (например, доцетаксела или паклитаксела), аналога нуклеозида (например, гемцитабина) или любой комбинации перечисленного.

Рак, такой как рак головы и шеи, может быть связан с присутствием мутаций. Такие мутации включают мутации в известных онкогенах, таких как PIK3CA, KRAS, BRAF, HRAS, MAP2K1 и NOTCH1. Онкогенные мутации обычно описывают как активирующие мутации или мутации, которые приводят к новым функциям. В другой тип раковой мутации вовлечены гены-супрессоры опухолей, такие как TP53, MLH1, CDKN2A и PTEN. Мутации в генах-супрессорах опухолей обычно являются инактивирующими.

Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в одном или более генах сигнального пути рЭФР. Предпочтительно, указанная мутация присутствует в гене, продукт экспрессии которого активен в сигнальном пути рЭФР на следующих после рЭФР этапах. Более предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в одном или более генах сигнального пути рЭФР, который не активен на следующих после рЭФР этапах.

Предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в гене и кодируемом им белковом продукте, выбранных из AKT1, KRAS, MAP2K1, NRAS, HRAS, PIK3CA, PTEN и рЭФР. Более предпочтительно, указанный рак имеет мутацию в гене, кодирующем HRAS и/или PLCG2.

Указанная мутация в гене HRAS предпочтительно представляет собой миссенс-мутацию, соматическую мутацию и/или мутацию онкогенного фактора. Более предпочтительно, HRAS содержит мутацию G12S в последовательности белка, или миссенс-мутацию G>A, приводящую к изменению аминокислоты G>S, более предпочтительно миссенс-мутацию G34A в кодирующей последовательности (CDS) соответствующего кодона GGC гена HRAS. Предпочтительно, указанный рак представляет собой плоскоклеточную карциному полости рта или плоскоклеточную карциному слизистой оболочки щеки, и содержит миссенс-мутацию G12S в гене, кодирующем HRAS.

Мутация в гене PLCG2 предпочтительно представляет собой мутацию R956H, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты R>H, или миссенс-мутацию G2867A в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGC гена PLCG2.

Указанный рак может иметь мутацию в гене, кодирующем MAP2K1. Указанная мутация в гене MAP2K1 предпочтительно представляет собой миссенс-мутацию, соматическую мутацию и/или мутацию онкогенного фактора. Более предпочтительно, MAP2K1 содержит мутацию L375R в последовательности белка, или миссенс-мутацию T>G, которая приводит к изменению аминокислоты L>R, более предпочтительно миссенс-мутацию T1124G в кодирующей последовательности (CDS) соответствующего кодона CTC в гене, кодирующем MAP2K1.

Предпочтительно, указанный рак не имеет мутации в гене, кодирующем PIK3C2B и/или RPTN11. Предпочтительно, мутация в PIK3C2B включает мутацию E1169K в последовательности белка, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты E>K, более

предпочтительно миссенс-мутацию G3505A в кодирующей последовательности (CDS) соответствующего кодона GAG гена, кодирующего PIK3C2B. Предпочтительно, мутация в RPTN11 включает мутацию G39E в последовательности белка, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты G>E, более предпочтительно миссенс-мутацию G116A в кодирующей последовательности (CDS) соответствующего кодона GGA гена, кодирующего RPTN11.

Notch 1 (HGNC ID 7881; NOTCH1), также известный как AOS5, hN1, AOVD1 и TAN1, представляет собой ген, который кодирует трансмембранный белок, функционирующий в нескольких процессах при развитии и при взаимодействиях между смежными клетками. Указанный трансмембранный белок также функционирует как рецептор для мембраносвязанных лигандов. Слияния, миссенс-мутации, нонсенс-мутации, молчащие мутации, делеции и инсерции со сдвигом рамки, и делеции и инсерции внутри рамки считывания наблюдаются при таких видах рака, как рак пищевода, гематопоэтический и лимфоидный рак, и рак желудка. NOTCH1 изменен в 4,48% случаев всех видов рака, при этом аденокарцинома ободочной кишки, аденокарцинома легкого, инвазивная протоковая карцинома молочной железы, эндометриодная аденокарцинома эндометрия и плоскоклеточная карцинома кожи отличаются наибольшей распространенностью изменений. При плоскоклеточной карциноме головы и шеи NOTCH1 изменен приблизительно у 16% пациентов (источник: The AACR Project GENIE Consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7(8):818-831).

TP53 (HGNC ID 11998) кодирует транскрипционный фактор, который регулирует некоторые виды активности, включая стресс-ответ и пролиферацию клеток. Мутации в TP53 ассоциированы с различными видами рака и, по расчетам, возникают при более чем 50% видов рака человека, в том числе при раке желудка и раке пищевода. В частности, мутация TP53 R248Q, как было показано, ассоциирована с раком, в том числе раком желудка и раком пищевода (Pitollì et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019 20:6241). Нонсенс-мутации в положениях R196 и R342 были идентифицированы при некоторых опухолях, например, молочной железы и пищевода; и яичника, предстательной железы, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, ободочной кишки/прямой кишки, легкого, пищевода, кости; соответственно (Priestly et al. *Nature* 2019 575: 210-216). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию TP53, в частности, мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии или активности TP53.

MLH1 (HGNC ID 7127; гомолог MutL 1) кодирует белок, вовлеченный в репарацию ошибок спаривания в ДНК и представляет собой известный ген-супрессор опухоли. Мутации в гене MLH1 ассоциированы с различными видами рака, в том числе раком желудочно-кишечного тракта. Низкие уровни MLH1 также ассоциированы с наличием семейного анамнеза рака пищевода у больных раком пищевода пациентов (Chang et al. *Oncol Lett.* 2015 9:430-436), и MLH1 мутирован у 1,39%

пациентов со злокачественными новообразованиями пищевода (источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). В частности, мутация MLH1 V384D, как было показано, ассоциирована с раком, например, раком ободочной и прямой кишки (Ohsawa et al. Molecular Medicine Reports 2009 2:887-891). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию MLH1, в частности, мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии или активности MLH1.

PIK3CA (HGNC: 8975, каталитическая субъединица альфа фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат-3-киназы) кодирует каталитическую субъединицу массой 110 кДа киназы PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа). Мутации в PIK3CA ассоциированы с различными видами рака, включая рак желудочно-кишечного тракта. По данным Американской ассоциации по изучению рака, PIK3CA мутирован у 12,75% пациентов со злокачественными солидными опухолями. В частности, мутация PIK3CA H1047R присутствует у 2,91% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями и E545K PIK3CA присутствует у 2,55% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями (см. источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.) Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию PIK3CA, в частности, онкогенную мутацию в PIK2CA.

PIK3C2B (HGNC: 8972, каталитическая субъединица фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназы типа 2 бета), кодирует белок, который принадлежит к семейству фосфоинозитид-3-киназ (PI3K). PI3-киназы играют роли в сигнальных путях, вовлеченных в пролиферацию клеток, онкогенную трансформацию, выживание клеток, миграцию клеток и внутриклеточный транспорт белков. Указанный белок содержит липидкиназный каталитический домен, а также С-концевой C2-домен, характерный для класса II PI3-киназ. C2-домены действуют как кальций-зависимые фосфолипид-связывающие мотивы, которые опосредуют транслокацию белков к мембранам, и могут также опосредовать межбелковые взаимодействия.

CDKN2A (HGNC ID 1787; ингибитор циклин-зависимой киназы 2A) кодирует белок, который ингибирует CDK4 и ARF. По данным Американской ассоциации по изучению рака, CDKN2A мутирован у 22,21% пациентов с карциномой пищевода, 28,7% пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода, и 6,08% пациентов с аденокарциномой желудка. В частности, мутация CDKN2A W110Ter присутствует приблизительно у 0,11% пациентов с раком. (источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). Согласно

некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию CDKN2A, в частности, мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии или активности CDKN2A.

PTEN (HGNC ID 9588; фосфатаза и гомолог тензина) кодирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу. По данным Американской ассоциации по изучению рака, PTEN мутирован у 6,28% пациентов с раком, 3,41% пациентов с аденокарциномой желудка, 2,37% пациентов с карциномой пищевода и у 2,22% пациентов с аденокарциномой пищевода. В частности, мутация PTEN R130Ter (где Ter относится к терминатору/стоп-кодону) присутствует у 0,21% всех пациентов с карциномой ободочной и прямой кишки (источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию PTEN, в частности, мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии или активности PTEN.

BRAF (HGNC ID: 1097) кодирует серин/треониновую протеинкиназу B-Raf, которая вовлечена в сигнализацию при росте. По данным Американской ассоциации по изучению рака, BRAF мутирован у 1,91% пациентов с карциномой желудка и у 1,93% пациентов с аденокарциномой желудка. В частности, мутация BRAF V600E присутствует у 2,72% пациентов с раком (см. источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию BRAF, в частности, онкогенную мутацию в BRAF.

KRAS (HGNC ID 6407; от «саркома крыс Кирстен») кодирует белок, входящий в путь RAS/MAPK. По данным Американской ассоциации по изучению рака, KRAS мутирован у 14,7% пациентов со злокачественными солидными опухолями, при этом KRAS G12C присутствует у 2,28% всех пациентов со злокачественными солидными опухолями (см. источник: The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 6.). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию KRAS, в частности, онкогенную мутацию в KRAS.

Продукт гена HRAS (HGNC ID:5173) вовлечен в активацию передачи сигнала белка Ras. Белки Ras связывают GDP/GTP и обладают собственной ГТФазной активностью. Соматические мутации в протоонкогене HRAS, как было показано, вовлечены в рак мочевого пузыря, карциному

щитовидной железы, карциному слюнных протоков, эпителиально-миоэпителиальную карциному и рак почек (Chiose et al., Am. J. of Surg. Path. 39 (6): 744–52; Chiose et al., Head and Neck Path. 2014. 8 (2): 146–50). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию HRAS, в частности, онкогенную мутацию в HRAS, более предпочтительно мутацию HRAS G12S. Рак представляет собой, в частности, ПКГШ полости рта или слизистой оболочки щеки.

MAP2K1 (HGNC ID:6840) принадлежит к группе митоген-активируемых протеинкиназ. Она активна в пути сигнализации MAP-киназ и кодирует белок митоген-активируемую протеинкиназу с двойной специфичностью 1. Как часть MAP-киназного пути, MAP2K1 вовлечена в многие клеточные процессы, в том числе в пролиферацию клеток, дифференцировку и транскрипционную регуляцию. MAP2K1 изменен в 1,05% случаев всех видов рака, при этом меланома кожи, аденокарцинома легкого, аденокарцинома ободочной кишки, меланома и инвазивная протоковая карцинома молочной железы отличаются наиболее высокой распространенностью изменений (источник: The AACR Project GENIE Consortium. Cancer Discovery. 2017;7(8):818-831. Dataset Version 8). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию MAP2K1, в частности, мутацию MAP2K1 L375R.

UGT1A1 (HGNC ID 12530; уридиндифосфатглюкуронозилтрансфераза 1A1) и UGT1A8 (уридиндифосфатглюкуронозилтрансфераза 1A8) кодируют ферменты пути глюкуронирования. Несколько полиморфизмов, которые снижают активность ферментов, как известно, влияют на метаболизм и эффект иринотекана. Например, аллель UGT1A1*6 (полиморфизм G71R) имеющая аллельную частоту около 0,13% в китайских, корейских и японских популяциях, а аллель UGT1A1*28 (полиморфизм динуклеотидных повторов в ТАТА-последовательности промоторной области) представляют собой факторы риска нейтропении, индуцированной иринотеканом. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические соединения согласно описанию в настоящем документе подходят для лечения рака, имеющего мутацию UGT1A1 и/или мутацию UGT1A8, в частности, мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии или активности UGT1A1 и/или UGT1A8.

Согласно настоящему документу рак головы и шеи предпочтительно содержит одну или более генетических мутаций, присутствующих в моделях рака головы и шеи HN2167, HN2590, HN2579, HN5124, HN3164, HN3642, HN3411 и/или HN5125 (см. таблицу 1), более предпочтительно одну или более генетических мутаций, присутствующих в моделях рака головы и шеи HN2167, HN2590, HN2579, HN5124, HN3642, HN3411 и/или HN5125. Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию.

Согласно настоящему документу рак головы и шеи имеет одну или более мутаций в пути LGR5 и/или в пути рЭФР, присутствующих в моделях, выбранных из группы, состоящей из HN5124, HN5125, HN2579, HN2590, HN2167, HN3642 и HN3164 (см. таблицу 1).

Согласно настоящему документу рак головы и шеи предпочтительно содержит одну или более онкогенных мутаций, присутствующих в моделях рака головы и шеи HN2167, HN2590, HN2579, HN5124, HN3164, HN3642, HN3411 и/или HN5125 (см. таблицу 1), более предпочтительно одну или более генетических мутаций, присутствующих в моделях рака головы и шеи HN2167, HN2590, HN2579, HN5124, HN3642, HN3411 и/или HN5125. Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при раке гортани или в модели HN2167, выбраны из группы, состоящей из мутаций CDKN2A (HGNC: 1787), CREBBP (HGNC: 2348), CUL1 (HGNC: 2551), ERHA3 (HGNC:3387), EXT1 (HGNC: 3512), FAT2 (HGNC: 3596), FOXP1 (HGNC: 3823), HIST1H3B (HGNC: 4776), HSP90AB1 (HGNC: 5258), IKZF3 (HGNC: 13178), IL6ST (HGNC: 6021), INHBA (HGNC: 6066), LMO1 (HGNC: 6641), LPP (HGNC: 6679), MSR1 (HGNC: 7376), NBN (HGNC: 7652), RAD54B (HGNC: 17228), RGS3 (HGNC: 9999), TAOK1 (HGNC: 29259), TP53 (HGNC: 11998) и WNK1 (HGNC: 14540). Более предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, плоскоклеточном раке гортани, включают мутации CDKN2A, CREPPB, CUL1 и/или TP53. Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. CDKN2A предпочтительно содержит делецию и/или мутацию со сдвигом рамки, в частности, делецию аминокислот RAGAR в положении 99–103 белка CDKN2A, более конкретно, делецию в нуклеиновой кислоте GGGCCGGGGCGCGG в положениях 296–309 кодирующей последовательности CDKN2A. CREPPB предпочтительно включает мутацию R1446C, или миссенс-мутацию C>T, которая приводит к изменению аминокислоты R>C, или миссенс-мутацию C4336T в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGC гена CREPPB. CUL1 предпочтительно включает мутацию D483N, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты D>N, или миссенс-мутацию G1447A в кодирующей последовательности (CDS) кодона GAT гена CUL1. TP53 предпочтительно включает мутацию R273C, или миссенс-мутацию C>T, которая приводит к изменению аминокислоты R>C, или миссенс-мутацию C817T в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGT гена TP53.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при плоскоклеточной карциноме языка, или в модели HN2590, выбраны из группы, состоящей из мутаций AHR (HGNC:348), ALK (HGNC:427), АТФ6АР2 (HGNC:18305), CDKN2A (HGNC:1787),

EP300 (HGNC:3373), FGFR1 (HGNC:3688), FLT4 (HGNC:3767), FN1 (HGNC:3778), HLA-B (HGNC:4932), IREB2 (HGNC:6115), MCM8 (HGNC:16147), PLCG2 (HGNC:9066), RB1 (HGNC:9884), THRAP3 (HGNC:22964), TP53 (HGNC:11998), WNK1 (HGNC:14540), YBX1 (HGNC:8014) и ZNF638 (HGNC:17894). Более предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при раке языка, включают мутации EP300, PLCG2 и/или TP53. Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. EP300 предпочтительно включает мутацию S1730C, или миссенс-мутацию C>G, которая приводит к изменению аминокислоты S>C, или миссенс-мутацию C5189G в кодирующей последовательности (CDS) кодона TCT гена EP300. PLCG2 предпочтительно включает мутацию R956H, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты R>H, или миссенс-мутацию G2867A в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGC гена PLCG2. TP53 предпочтительно включает мутацию G245S, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты G>S, или миссенс-мутацию G733A в кодирующей последовательности (CDS) кодона GGC гена TP53.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при плоскоклеточной карциноме слизистой оболочки щеки, или в модели HN2579, выбраны из группы, состоящей из мутаций DCC (HGNC:2701), DLC1 (HGNC: 2897), HRAS (HGNC:5173), LZTS1 (HGNC: 13861), SMARCA4 (HGNC: 11100) и WRN (HGNC: 12791). Более предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при плоскоклеточном раке слизистой оболочки щеки, включают мутации HRAS. Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. HRAS предпочтительно включает мутацию G12S в последовательности белка, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению аминокислоты G>S, более предпочтительно миссенс-мутацию G34A в кодирующей последовательности (CDS) кодона GGC гена HRAS.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, или в модели HN5124, выбраны из группы, состоящей из мутаций APC (HGNC: 583), ERCC6 (HGNC: 3438), MAD1L1 (HGNC: 6762) и ROS1 (HGNC: 10261). Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. APC предпочтительно включает мутацию R2505Q в последовательности белка, или миссенс-мутацию G>A, которая приводит к изменению R>Q, более предпочтительно миссенс-мутацию G7514A в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGA гена APC.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при аденокарциноме или аденокарциноме околоушной железы, или в модели HN3164, выбраны из

группы, состоящей из мутаций DLC1 (HGNC: 2897), ERHA4 (HGNC: 3388), KIAA1549 (HGNC: 22219), MAP2K1 (HGNC: 6840), MSH3 (HGNC: 7326) и TP53 (HGNC: 11998). Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. MAP2K1 предпочтительно включает мутацию L375R в последовательности белка, или миссенс-мутацию T>G, которая приводит к изменению аминокислоты L>R, более предпочтительно миссенс-мутацию T1124G в кодирующей последовательности (CDS) кодона CTC гена MAP2K1. TP53 предпочтительно включает мутацию Y234C в последовательности белка, или миссенс-мутацию A>G, которая приводит к изменению аминокислоты Y>C, более предпочтительно миссенс-мутацию A701G в кодирующей последовательности (CDS) кодона TAC гена TP53.

Предпочтительно, указанные одна или более мутаций при раке головы и шеи, в частности, при плоскоклеточной карциноме шеи, или в модели HN5125, выбраны из группы, состоящей из мутаций ATM (HGNC: 795), ECT2L (HGNC: 21118), HLA-B (HGNC: 4932), ITGA9 (HGNC: 6145), RB1 (HGNC: 9884), RGS3 (HGNC: 9999), SOX17 (HGNC: 18122) и TP53 (HGNC: 11998). Указанные мутации предпочтительно представляют собой соматические мутации, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции или любую их комбинацию. SOX17 предпочтительно включает мутацию L156P в последовательности белка, или миссенс-мутацию T>C, которая приводит к изменению аминокислоты L>P, более предпочтительно миссенс-мутацию T467C в кодирующей последовательности (CDS) кодона CTG гена SOX17. TP53 предпочтительно включает мутацию R337C в последовательности белка, или миссенс-мутацию C>T, которая приводит к изменению аминокислоты R>C, более предпочтительно миссенс-мутацию C1009T в кодирующей последовательности (CDS) кодона CGC гена TP53.

Антитело или а его функциональная часть, производное и/или аналог согласно описанию в настоящем документе содержит вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), и вариабельный домен, который связывает LGR5. Указанный рЭФР предпочтительно представляет собой рЭФР человека. LGR5 предпочтительно представляет собой LGR5 человека. Антитело или а его функциональная часть, производное и/или аналог согласно описанию в настоящем документе содержит вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) человека, и вариабельный домен, который связывает LGR5 человека.

Предпочтительно, антитело или а его функциональная часть, производное и/или аналог согласно описанию в настоящем документе содержит вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) и влияет на связывание ЭФР с рецептором, и вариабельный домен, который связывает LGR5, причем взаимодействие антитела с LGR5 на экспрессирующей LGR5 клетке не блокирует связывание R-спондина (RSPO) с LGR5.

Способы определения того, блокирует ли антитело связывание R-спондина с LGR5, описаны в WO2017069528, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Указание в настоящем документе номеров доступа или альтернативных названий белков/генов в первую очередь предназначено для обеспечения дополнительного способа идентификации упомянутого белка как мишени, фактическая последовательность целевого белка, связанного антителом согласно настоящему изобретению может варьировать, например, из-за мутации и/или альтернативного сплайсинга в кодирующем гене, таких как возникающие при некоторых видах рака или т.п. Целевой белок связывается антителом, пока эпитоп присутствует в указанном белке и указанный эпитоп доступен для антитела. Антитело или а его функциональная часть, производное и/или аналог согласно описанию в настоящем документе предпочтительно влияет на связывание лиганда рЭФР с рЭФР. Термин «влияет на связывание» в настоящем документе означает, что связывание антитела или его функциональной части, производного и/или аналога с рЭФР конкурирует с лигандом за связывание с рецептором ЭФР. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог могут снижать связывание лиганда, замещать лиганд, если он уже связан с рецептором ЭФР, или может, например, в результате стерического затруднения по меньшей мере частично предотвращать возможность связывания лиганда рецептором ЭФР.

Антитело к рЭФР, описанное в настоящем документе, соответственно, предпочтительно ингибирует индуцируемую лигандом рЭФР сигнализацию, измеряемую по индуцируемому лигандом росту клеток VxPC3 (ATCC CRL-1687) или VxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058), или по индуцируемой лигандом смерти клеток A431 (ATCC CRL-1555). рЭФР может связывать несколько лигандов и стимулировать рост упомянутых клеток VxPC3 или VxPC3-luc2. Присутствие лиганда рЭФР стимулирует рост клеток VxPC3 или VxPC3-luc2. Индуцируемый лигандом рЭФР рост клеток VxPC3 может быть измерен путем сравнения роста указанных клеток в отсутствие и в присутствии лиганда. Предпочтительным лигандом рЭФР для измерения индуцируемого лигандом рЭФР роста клеток VxPC3 или VxPC3-luc2 является ЭФР. Индуцируемый лигандом рост предпочтительно измеряют с применением насыщающих количеств лиганда. Согласно предпочтительному варианту реализации ЭФР применяют в количестве 100 нг/мл культуральной среды. ЭФР представляет собой предпочтительно ЭФР от R&D Systems, кат. № 396-NB и кат. №236-EG (см. также WO2017/069628; включен посредством ссылки в настоящий документ).

Антитело к рЭФР, описанное в настоящем документе, предпочтительно ингибирует индуцируемый лигандом рЭФР рост клеток VxPC3 (ATCC CRL-1687) или клеток VxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058). рЭФР может связывать несколько лигандов и стимулировать рост упомянутых клеток VxPC3 или клеток VxPC3-luc2. Присутствие лиганда стимулирует рост клеток VxPC3 или VxPC3-luc2. Индуцируемый лигандом рЭФР рост клеток VxPC3 может быть измерен

путем сравнения роста указанных клеток в отсутствие и присутствии лиганда. Предпочтительный лиганд рЭФР для измерения индуцируемого лигандом рЭФР роста клеток VxPC3 или клеток VxPC3-luc2 представлен ЭФР. Индуцируемый лигандом рост предпочтительно измеряют с применением насыщающих количеств лиганда. Согласно предпочтительному варианту реализации ЭФР применяют в количестве 100 нг/мл культуральной среды. ЭФР предпочтительно представляет собой ЭФР от R&D Systems, кат. № 396-NB и №236-EG (см. также WO2017/069628; включен посредством ссылки в настоящий документ).

Во избежание сомнений, рост клетки в настоящем документе относится к изменению количества клеток. Ингибирование роста относится к уменьшению количества клеток, которое было бы получено в ином случае. Увеличение роста относится к увеличению количества клеток, которое было бы получено в ином случае. Рост клетки обычно относится к пролиферации клетки.

Ингибирует ли антитело согласно описанию в настоящем документе сигнализацию или рост в мультиспецифическом формате, предпочтительно определяют с применением способа согласно описанию в настоящем документе выше с применением моноспецифического моновалентного или моноспецифического бивалентного варианта антитела. Такое антитело предпочтительно имеет сайты связывания рецептора, сигнализацию через который требуется определить. Моноспецифическое моновалентное антитело может иметь вариабельный домен с нерелевантной специфичностью связывания, например, специфичностью в отношении столбнячного токсина. Предпочтительное антитело представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, отличающееся тем, что антигенсвязывающие вариабельные домены состоят из вариабельных доменов, которые связывают член семейства рецепторов ЭФР.

В ходе программы поиска антител Biclomics® в Merus были разработаны мультиспецифические антитела, нацеленные на рЭФР и LGR5 (содержащий богатые лейцином повторы сопряженный с G-белком рецептор). Эффективность таких мультиспецифических антител оценивали *in vitro* и *in vivo* с использованием органоидов, происходящих от пациентов с CRC, и PDX-моделей на мышах, соответственно (см., например, WO2017/069628; включен посредством ссылки в настоящий документ). Было показано, что мультиспецифические антитела, нацеленные на рЭФР и LGR5, ингибируют рост опухоли. Показано, что эффективность таких ингибиторных антител коррелирует с уровнями экспрессии РНК LGR5 клетками рака. Мультиспецифические антитела, нацеленные на рЭФР и LGR5, согласно описанию в WO2017/069628, в частности, являются предпочтительными.

Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог согласно описанию в настоящем документе содержит вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5. Вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно

связывает эпитоп, локализованный в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности на фиг. 1, при этом остатки аминокислот D43, G44, M46, F67, R90 и F91 вовлечены в связывание указанного антитела с эпитопом.

5 Вариабельный домен против LGR5 предпочтительно представляет собой вариабельный домен, отличающийся тем, что одна или более замен остатков аминокислот LGR5 из D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A уменьшает связывание вариабельного домена с LGR5.

 Эпитоп на внеклеточной части LGR5 предпочтительно локализован в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности на фиг. 1. Предпочтительно это эпитоп, отличающийся
10 тем, что связывание вариабельного домена против LGR5 с LGR5 снижается при одной или более из следующих замен остатков аминокислот D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A в LGR5.

 Согласно настоящему изобретению также предложено антитело с вариабельным доменом, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и вариабельным доменом, который связывает
внеклеточную часть LGR5, при этом вариабельный домен для LGR5 связывает эпитоп на LGR5,
15 расположенный в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности на фиг. 1.

 Эпитоп на LGR5 предпочтительно представляет собой конформационный эпитоп. Указанный эпитоп предпочтительно локализован в пределах остатков аминокислот 40–95 последовательности на фиг. 1. Связывание антитела с LGR5 предпочтительно снижается при одной
20 или более следующих замен остатков аминокислот D43A; G44A, M46A, F67A, R90A и F91A.

 Без связи с какой-либо теорией считается, что M46, F67, R90 и F91 из LGR5, показанного на фиг. 1, представляют собой контактные остатки для вариабельного домена согласно описанию в настоящем документе выше, т.е. сайт связывания антигена вариабельного домена, который связывает эпитоп LGR5. Снижение связывания с антителом при замене остатков аминокислот D43A
25 и G44A может быть обусловлено тем, что указанные остатки также являются контактными, однако также возможно, что указанные замены остатков аминокислот индуцируют (незначительную) модификацию конформации части LGR5, где содержатся один или более других контактных остатков (т.е. в положениях 46, 67, 90 или 91), и изменение конформации происходит таким образом, что связывание антитела снижается. Указанный эпитоп характеризуется упомянутыми
30 заменами аминокислот. Определить, способно ли антитело связывать такой эпитоп, можно различными способами. В примере способа клетки CHO экспрессируют на клеточной мембране LGR5 или мутант с аланиновыми заменами, предпочтительно, мутант, содержащий одну или более из замен M46A, F67A, R90A или F91A. Тестируемое антитело приводят в контакт с клетками CHO и сравнивают связывание антитела с клетками. Тестируемое антитело связывает эпитоп, если оно
35 связывается с LGR5 и в меньшей степени с LGR5, имеющим замены M46A, F67A, R90A или F91A.

предпочтительно сравнение связывания с панелью мутантов, каждый из которых содержит одну замену на остаток аланина. Такие исследования связывания хорошо известны в данной области техники. Часто панель включает мутанты с одиночными заменами на аланин, захватывающими по существу все остатки аминокислот. В панели для LGR5 должна быть захвачена только внеклеточная часть белка и часть, которая обеспечивает связывание с клеточной мембраной, разумеется, если используются клетки. Экспрессия конкретного мутанта может быть нарушена, но это легко детектировать с помощью одного или нескольких антител к LGR5, которые связываются с разными областями. Если экспрессия также снижена по результатам использования указанных контрольных антител, уровень или кратность уровня экспрессии указанного конкретного мутанта белка на мембране нарушены. На основании характеристик связывания тестируемого антитела с панелью легко определить, демонстрируют ли тестируемые антитела пониженное связывание с мутантами, содержащими замену M46A, F67A, R90A или F91A, и, соответственно, представляет ли собой тестируемое антитело согласно настоящему изобретению. Пониженное связывание с мутантами, содержащими замену M46A, F67A, R90A или F91A также указывает на расположение эпитопа в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности на фиг. 1. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная панель включает мутант с заменой D43A; мутант с заменой G44A; или оба этих мутанта. Антитело с последовательностью VH, соответствующей VH MF5816, демонстрирует пониженное связывание с мутантами, содержащими указанные замены.

Без связи с конкретной теорией считается, что остатки аминокислот I462; G465; K489; I491; N493; и C499, представленные на фиг. 2, вовлечены в связывание эпитопа антителом, содержащим переменный домен согласно описанию в настоящем документе выше. Участие в связывании предпочтительно определяют, наблюдая пониженное связывание переменного домена с рЭФР, содержащим одну или более замен остатков аминокислот, выбранных из I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; и C499A.

Согласно одному аспекту переменный домен, который связывает эпитоп на внеклеточной части рЭФР человека представляет собой переменный домен, который связывает эпитоп, локализованный в пределах остатков аминокислот 420–480 последовательности, показанной на фиг. 2. Предпочтительно, связывание переменного домена с рЭФР снижается при одной или более следующих замен остатков аминокислот I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; и C499A в рЭФР. Связывание антитела с человека рЭФР предпочтительно влияет на связывание ЭФР с рецептором. Эпитоп на рЭФР предпочтительно представляет собой конформационный эпитоп. Согласно одному аспекту указанный эпитоп локализован в пределах остатков аминокислот 420–480 последовательности, показанной на фиг. 2, предпочтительно в пределах остатков 430–480 последовательности, показанной на фиг. 2; предпочтительно в пределах остатков 438–469 последовательности, показанной на фиг. 2.

Без связи с какой-либо теорией считается, что контактные остатки эпитопа, т.е. остатки вариабельного домена, через которые он контактирует с рЭФР человека, вероятно, представлены остатками I462; K489; I491; и N493. Остатки аминокислот G465 и C499, вероятно, непрямо вовлечены в связывание указанного антитела с рЭФР.

5 Вариабельный домен, который связывает рЭФР человека, предпочтительно представляет собой вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере последовательность CDR3 из VH MF3755, показанной на фиг. 3, или последовательность CDR3, которая отличается самое большее тремя, предпочтительно самое большее двумя аминокислотами, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности
10 CDR3 из VH MF3755, показанной на фиг. 3.

Вариабельный домен, который связывает человека рЭФР, предпочтительно представляет собой вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VH MF3755, показанной на фиг. 3; или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VH MF3755, показанной на фиг. 3, с самое большее
15 тремя, предпочтительно самое большее двумя заменами, предпочтительно самое большее одной заменой аминокислоты.

Вариабельный домен, который связывает человека рЭФР, предпочтительно представляет собой вариабельный домен с вариабельной областью тяжелой цепи, которая содержит последовательность VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или последовательность аминокислот
20 VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно VH-цепи MF3755.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и вариабельный домен,
25 который связывает внеклеточную часть LGR5, при этом вариабельная область тяжелой цепи указанного вариабельного домена содержит по меньшей мере последовательность CDR3 специфической в отношении рЭФР вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на фиг. 3, или вариабельная область тяжелой цепи указанного вариабельного домена содержит последовательность CDR3
30 тяжелой цепи, которая отличается самое большее тремя, предпочтительно самое большее двумя аминокислотами, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на фиг. 3. Указанный вариабельный домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательность CDR3 MF3370; MF3755; MF4280
35 или MF4289, показанных на фиг. 3.

Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 специфической в отношении рЭФР переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на фиг. 3, или переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются самое большее тремя, предпочтительно самое большее двумя аминокислотами, предпочтительно самое большее одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 специфической в отношении рЭФР переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на фиг. 3. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 MF3370; MF3755; MF4280 или MF4289, показанных на фиг. 3. Предпочтительная переменная область тяжелой цепи представлена MF3755. Другая предпочтительная переменная область тяжелой цепи представлена MF4280.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, отличающееся тем, что связывающий рЭФР переменный домен имеет последовательность CDR3, CDR1, CDR2 и CDR3 и/или VH согласно описанию в настоящем документе выше, предпочтительно имеет переменный домен, который связывает LGR5, который содержит по меньшей мере последовательность CDR3 специфической в отношении LGR5 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, показанных на фиг. 3, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, которая отличается самое большее тремя, предпочтительно самое большее двумя аминокислотами, предпочтительно не более чем одной аминокислотой от последовательности CDR3 VH, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, показанных на фиг. 3. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательность CDR3 MF5790; MF5803; MF 5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, показанные на фиг. 3.

Переменный домен LGR5 предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 специфической в отношении LGR5 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, которые приведены на фиг. 3, или последовательностей тяжелых цепей CDR1, CDR2 и CDR3, отличающихся самое большее тремя, предпочтительно самое большее двумя, предпочтительно самое большее одной аминокислотой от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 специфической в отношении LGR5 переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из MF5790; MF5803;

MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, которые приведены на фиг. 3. Указанный переменный домен предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818, которые приведены на фиг. 3.

5 Предпочтительные переменные области тяжелых цепей представлены MF5790; MF5803; MF5814; MF5816; MF5817; или MF5818. В частности предпочтительные переменные области тяжелых цепей представлены MF5790; MF5814; MF5816; и MF5818; предпочтительно, MF5814, MF5818 и MF5816, переменная область тяжелой цепи MF5816, в частности, является предпочтительной. Другая предпочтительная переменная область тяжелой цепи представлена MF5818.

10 Было показано, что антитела, содержащие один или более переменных доменов с переменным областью тяжелой цепи MF3755 или одной или более ее CDR, имеют более высокую эффективность при применении для ингибирования роста реагирующих на лиганд рЭФР рака или клетки. В контексте биспецифических или мультиспецифических антител плечо антитела, содержащее переменный домен с переменным областью тяжелой цепи MF3755 или одну или
15 более ее CDR, хорошо комбинировать с плечом, содержащим переменный домен с переменным областью тяжелой цепи MF5818 или одной или более ее CDR.

VH-цепи переменных доменов, которые связывают рЭФР или LGR5, могут иметь одну или более замен аминокислот относительно последовательности, показанной на фиг. 3. VH-цепь предпочтительно имеет последовательность аминокислот VH рЭФР или VH LGR5 согласно фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно
20 имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно последовательности VH-цепи согласно фиг. 3.

Последовательности CDR могут иметь один или более замен остатков аминокислот относительно последовательности CDR на фигурах. Такие одну или более замен, например,
25 осуществляют с целью оптимизации, предпочтительно для повышения силы связывания или стабильности антитела. Оптимизацию, например, осуществляют с применением процедур мутагенеза, после чего предпочтительно тестируют итоговые антитела на стабильность и/или аффинность связывания, и предпочтительно выбирают усовершенствованную специфическую в отношении рЭФР последовательность CDR или специфическую в отношении LGR5
30 последовательность CDR. Специалист в данной области техники способен успешно получить варианты антитела, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR в соответствии с настоящим изобретением. Например, может применяться консервативная замена аминокислоты. Примеры консервативных замен аминокислот включают замену одним гидрофобным остатком, таким как изолейцин, валин, лейцин или метионин, другого гидрофобного

остатка, и замену одним полярным остатком другого полярного остатка, такую как замена аргинином лизина, глутаминовой кислотой аспарагиновой кислоты, или глутамином аспарагина.

Предпочтительно, упомянутые самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен аминокислот в VH или VL, согласно описанию в настоящем документе, предпочтительно представляют собой консервативные замены аминокислот. Инсерции, делеции и замены аминокислот в VH или VL, согласно описанию в настоящем документе, предпочтительно не присутствуют в области CDR3. Упомянутые инсерции, делеции и замены аминокислот предпочтительно также не присутствуют в областях CDR1 и CDR2. Упомянутые инсерции, делеции и замены аминокислот предпочтительно также не присутствуют в области FR4.

Упомянутые самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен аминокислот представляют собой предпочтительно консервативные замены, указанные инсерции, делеции, замены аминокислот или комбинация перечисленного предпочтительно находятся не в области CDR3 VH-цепи, предпочтительно не в области CDR1, CDR2 или CDR3 VH-цепи и предпочтительно не в области FR4.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или
– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH; и

при этом VH-цепь переменного домена, который связывает LGR5, содержит
– последовательность аминокислот VH-цепи MF5790, показанной на фиг. 3; или
– последовательность аминокислот VH-цепи MF5790, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH; и

5 при этом VH-цепь вариабельного домена, который связывает LGR5, содержит
 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5803, показанной на фиг. 3; или
 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5803, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно
 10 указанной VH.

Антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или
 15 – последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH; и

при этом VH-цепь вариабельного домена, который связывает LGR5, содержит
 20 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5814, показанной на фиг. 3; или
 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5814, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH.

25 Антитело, содержащее вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и вариабельный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или
 – последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую
 30 самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2, 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH; и

при этом VH-цепь вариабельного домена, который связывает LGR5, содержит
 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанной на фиг. 3; или
 35 – последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанной на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2,

3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно
5 содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3; или

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую
самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2,
3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно
10 указанной VH; и

при этом VH-цепь переменного домена, который связывает LGR5, содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF5817, показанной на фиг. 3; или

– последовательность аминокислот VH-цепи MF5817, показанной на фиг. 3, имеющую
самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2,
15 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно
указанной VH.

Антитело, содержащее переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, предпочтительно
20 содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3 или

– последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанной на фиг. 3, имеющую
самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2,
3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно
указанной VH; и

при этом VH-цепь переменного домена, который связывает LGR5, содержит

– последовательность аминокислот VH-цепи MF5818, показанной на фиг. 3; или

– последовательность аминокислот VH-цепи MF5818, показанной на фиг. 3, имеющую
самое большее 15, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и предпочтительно имеющую 1, 2,
25 3, 4 или 5 инсерций, делеций, замен аминокислот или комбинацию перечисленного относительно
указанной VH.
30

Дополнительные варианты описанных в настоящем документе последовательностей аминокислот, которые сохраняют связывание с рЭФР или LGR5, могут быть получены, например,
из библиотек фагового дисплея, которые содержат реаранжированную IGKVI-39/IGKJI область VL
человека (De Kruijff et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50), и серию областей VH, включающих
35 замены аминокислот в последовательности аминокислот области VH против рЭФР или LGR5, в

соответствии с описанием в настоящем документе, согласно приведенному ранее описанию (например, WO2017/069628). Фаги, кодирующие Fab-области, которые связывают рЭФР или LGR5, могут быть выбраны и проанализированы с помощью проточной цитометрии, и секвенированы для идентификации вариантов с заменами, инсерциями, делециями или добавлениями аминокислот, которые сохраняют связывание с антигенами.

Вариабельные области легких цепей переменных доменов VH/VL против рЭФР и LGR5 антитела к рЭФР/LGR5 могут быть одинаковыми или разными. Согласно некоторым вариантам реализации область VL переменного домена VH/VL против рЭФР антитела к рЭФР/LGR5 аналогична области VL переменного домена VH/VL против LGR5. Согласно некоторым вариантам реализации области VL в первом и втором переменных доменах VH/VL идентичны.

Согласно определенным аспектам переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержит переменную область общей легкой цепи. Согласно некоторым аспектам указанная переменная область общей легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит V-сегмент переменной области IgVκ1-39 зародышевой линии. Согласно определенному аспекту переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит V-сегмент легкой цепи каппа IgVκ1-39*01. IgVκ1-39 – сокращенное обозначение гена переменной цепи каппа иммуноглобулина 1–39. Указанный ген также известен как переменная цепь каппа иммуноглобулина 1–39; IGKV139; IGKV1-39. Внешние идентификаторы для указанного гена: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Последовательность аминокислот подходящей V-области приведена на фиг. 4. Указанная V-область может быть скомбинирована с одной из пяти J-областей. Предпочтительные J-области – jk1 и jk5, и объединенные последовательности обозначают как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия – IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT, адрес в сети Интернет imgt.org). Согласно некоторым вариантам реализации переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL содержит легкую цепь каппа IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ1*05 (представлены на фиг. 4).

Согласно некоторым аспектам переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 содержит LCDR1, содержащую последовательность аминокислот QSISSY (представлена на фиг. 4), LCDR2, содержащую последовательность аминокислот AAS (представлена на фиг. 4), и LCDR3, содержащую последовательность аминокислот QQSYSTP (представлена на фиг. 4) (т.е. области CDR IGKV1-39 в соответствии с IMGT). Согласно некоторым аспектам переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержит LCDR1, содержащую последовательность аминокислот QSISSY (представлена на фиг. 4), LCDR2,

содержащую последовательность аминокислот AASLQS (представлена на фиг. 4), и LCDR3, содержащую последовательность аминокислот QQSYSTP (представлена на фиг. 4).

Согласно некоторым аспектам один или оба переменных домена VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичную или на 100% идентичную последовательности аминокислот, приведенной на фиг. 4. Согласно некоторым аспектам один или оба переменных домена VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичную или на 100% идентичную последовательности аминокислот, приведенной на фиг. 4.

Например, согласно некоторым аспектам переменная легкая цепь одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 может иметь 0–10, предпочтительно 0–5 инсерций, делеций, замен, добавлений аминокислот или комбинацию перечисленного относительно последовательности на фиг. 4. Согласно некоторым аспектам переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержит 0–9, 0–8, 0–7, 0–6, 0–5, 0–4, предпочтительно 0–3, предпочтительно 0–2, предпочтительно 0–1 и предпочтительно 0 инсерций, делеций, замен, добавлений аминокислот относительно указанной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного.

Согласно другим аспектам переменная область легкой цепи одного или обоих переменных доменов VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержит последовательность аминокислот из последовательности, показанной на фиг. 4. Согласно определенным аспектам оба переменных домена VH/VL антитела к рЭФР/LGR5 содержат идентичные области VL. Согласно одному варианту реализации VL обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 содержит последовательность аминокислот, приведенную на фиг. 4. Согласно одному аспекту VL обоих переменных доменов VH/VL биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 содержит последовательность аминокислот, приведенную на фиг. 4.

Антитело к рЭФР/LGR5 согласно описанию в настоящем документе предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два переменных домена, один из которых связывает рЭФР, а другой связывает LGR5, согласно описанию в настоящем документе. Биспецифические антитела к рЭФР/LGR5 для применения в способах согласно описанию в настоящем документе могут быть предложены в нескольких форматах. Множество разных

форматов биспецифических антител известны в данной области техники, и их обзор приведен в источниках: Kontermann (Drug Discov Today, 2015 Jul;20(7):838-47; MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97) и Spiess et al., (Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Например, форматы биспецифических антител, не являющиеся классическими антителами с двумя комбинациями VH/VL, имеют по меньшей мере переменный домен, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Указанный переменный домен может быть соединен с одноцепочечным Fv-фрагментом, мономером, VH и Fab-фрагментом, что обеспечивает вторую связывающую активность.

Согласно некоторым аспектам биспецифические антитела к рЭФР/LGR5, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, обычно представлены подклассом IgG человека (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Согласно определенным аспектам указанные антитела относятся к подклассу IgG1 человека. Полноразмерные IgG-антитела являются предпочтительными ввиду благоприятного времени полужизни и по причине низкой иммуногенности. Соответственно, согласно определенным аспектам биспецифическое антитело к рЭФР/LGR5 представляет собой полноразмерную молекулу IgG. Согласно одному аспекту биспецифическое антитело к рЭФР/LGR5 представляет собой полноразмерную молекулу IgG1.

Соответственно, согласно определенным аспектам биспецифическое антитело к рЭФР/LGR5 содержит кристаллизуемый фрагмент (Fc). Fc биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 предпочтительно состоит из константной области человека. Константная область или Fc биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 может содержать один или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 отличий аминокислот относительно константной области встречающегося в природе антитела человека. Например, согласно определенным аспектам каждое Fab-плечо указанных биспецифических антител может дополнительно включать Fc-область, содержащую модификации, обеспечивающие образование биспецифического антитела, способствующие стабильности и/или другим признакам, описанным в настоящем документе.

Биспецифические антитела, как правило, продуцируют клетки, которые экспрессируют нуклеиновую кислоту (кислоты), кодирующие антитело. Соответственно, согласно некоторым аспектам биспецифические антитела к рЭФР/LGR5 согласно описанию в настоящем документе продуцируют путем получения клетки, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют переменные области и константные области тяжелых и легких цепей биспецифического антитела к рЭФР/LGR5. Указанная клетка предпочтительно представляет собой животную клетку, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно клетку человека. Подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать биспецифическое антитело к рЭФР/LGR5.

Подходящие клетки для получения антител известны в данной области техники и включают гибридную клетку, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6. Различные организации и компании разработали линии клеток для широкомасштабного получения антител, например, для клинического применения. Неограничивающие примеры таких линий
5 клеток представлены клетками CHO, клетками NS0 или клетками PER.C6. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку человека. Предпочтительно, клетку трансформируют E1-областью аденовируса или ее функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой линии клеток является линия клеток PER.C6 или ее эквивалент. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка
10 представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительно, указанный вариант использует глутаминсинтетазную (GS) векторную систему для экспрессии антитела. Согласно одному предпочтительному аспекту указанная клетка представляет собой клетку CHO.

Согласно некоторым аспектам указанная клетка экспрессирует легкие и тяжелые цепи, отличные от составляющих биспецифическое антитело к рЭФП/LGR5. Согласно определенным
15 аспектам указанная клетка экспрессирует две разных тяжелых цепи и по меньшей мере одну легкую цепь. Согласно одному предпочтительному варианту реализации указанная клетка экспрессирует «общую легкую цепь» согласно описанию в настоящем документе для снижения количества разных видов антител (комбинаций разных тяжелых и легких цепей). Например, соответствующие области
20 VH клонируют в экспрессионные векторы с применением способов, известных в данной области техники для получения биспецифических IgG (WO2013/157954; включен в настоящий документ посредством ссылки), в сочетании с реаранжированной легкой цепью IGKV1 39/IGKJ1 (huVκ1 39) человека, как ранее было показано, способной к спариванию более чем с одной тяжелой цепью, образуя таким образом антитела с разнообразной специфичностью, что облегчает получение биспецифических молекул (De Kruijff et al. J. Mol. Biol. 2009 (387) 548-58; WO2009/157771).

Продуцирующая антитело клетка, которая экспрессирует общую легкую цепь и равные количества двух тяжелых цепей, как правило, продуцирует 50% биспецифического антитела и 25% каждого из моноспецифических антител (т.е. имеющих идентичные комбинации тяжелых и легких
25 цепей). Из опубликованных источников известно несколько методов, способствующих преимущественному продуцированию биспецифических антител, а не соответствующих моноспецифических антител. Это, как правило, достигается путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, чтобы они способствовали гетеродимеризации (т.е.
30 димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелой/легкой цепи), а не гомодимеризации. Согласно предпочтительному аспекту биспецифическое антитело по настоящему изобретению включает две разных тяжелых цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами
35 гетеродимеризации. Различные совместимые домены гетеродимеризации были описаны в данной области техники. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой

совместимые СНЗ-домены гетеродимеризации тяжелой цепи иммуноглобулина. В данной области техники описаны различные способы, позволяющие достигнуть такой гетеродимеризации тяжелых цепей.

Один предпочтительный способ получения биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 раскрыт в US 9248181 и US 9358286. В частности, предпочтительные мутации для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG представлены заменами аминокислот L351K и T366K (нумерация EU) в первом СНЗ-доме («КК-вариант» тяжелой цепи) и заменами аминокислот L351D и L368E во втором домене («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот. Согласно приведенному ранее описанию, DE-вариант и КК-вариант преимущественно спариваются с образованием гетеродимеров (так называемые биспецифические молекулы «ДЕКК»). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или КК-вариант тяжелых цепей (гомодимеры КККК) почти никогда не происходит из-за выраженного отталкивания заряженных остатков в интерфейсе СНЗ-СНЗ идентичных тяжелых цепей.

Соответственно, согласно одному аспекту комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, которая содержит вариабельный домен, который связывает рЭФР, содержит DE-вариант тяжелой цепи. Согласно указанному варианту реализации комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, которая содержит вариабельный домен, который связывает LGR5, содержит КК-вариант тяжелой цепи.

Кандидатное биспецифическое IgG-антитело к рЭФР/LGR5 может быть протестировано на связывание с применением любого подходящего анализа. Например, оценка связывания с экспрессируемым на мембране рЭФР или LGR5 на клетках CHO может быть выполнена с помощью проточной цитометрии (в соответствии с процедурой FACS согласно приведенному ранее описанию в WO2017/069628). Согласно одному аспекту связывание кандидатного биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 с LGR5 на клетках CHO демонстрируют с помощью проточной цитометрии, которую проводят в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Связывание с клетками CHO сравнивают с клетками CHO, которые не были трансфицированы экспрессионными кассетами с рЭФР и/или LGR5. Связывание кандидатного биспецифического IgG1 с рЭФР определяют с применением клеток CHO, трансфицированных экспрессионной конструкцией с рЭФР; моноспецифическое антитело к LGR5 и моноспецифическое антитело к рЭФР, а также нерелевантное изотипическое контрольное mAb IgG1 включают в анализ в качестве контрольных (например, антитело, которое связывает LGR5 и другой антиген, такой как столбнячный токсин (ТТ)).

Аффинность направленных на LGR5 и рЭФР Fab-фрагментов кандидатного биспецифического антитела к рЭФР/LGR5 в отношении их мишеней может быть измерена с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием Biacore

T100. Вкратце, моноклональное антитело мыши против IgG человека (Becton and Dickinson, кат.№ 555784) связывают с поверхностью сенсорного CM5-чипа с применением химии свободных аминов (NHS/ EDC). Затем биспецифическое антитело (bsAb) захватывают на поверхности сенсора. Затем рекомбинантные очищенные антигены рЭФР человека (Sino Biological Inc, кат.№ 11896-H07H) и белок LGR5 человека проводят по поверхности сенсора в диапазоне концентраций для измерения скоростей связывания и диссоциации. После каждого цикла поверхность чипа регенерируют импульсным введением HCl, и снова проводят захват bsAb. По полученным сенсограммам определяют скорости связывания и диссоциации и значения аффинности связывания с LGR5 и рЭФР человека с использованием программного обеспечения BIAevaluation, согласно приведенному ранее описанию для CD3 в US 2016/0368988.

Антитело согласно описанию в настоящем документе, как правило, представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело, предпочтительно из подкласса IgG человека, предпочтительно из подкласса IgG1 человека. Такие антитела обладают выраженными АЗКЦ-свойствами, которые могут, если это требуется, быть усилены с помощью методик, известных в данной области техники, имеют благоприятное время полужизни при введении *in vivo* человеку, и существует технология конструирования СНЗ, которая может обеспечивать получение модифицированных тяжелых цепей, которые преимущественно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры при коэкспрессии в клетках клональных линий.

АЗКЦ-активность антитела может быть усовершенствована, если само по себе антитело имеет низкую АЗКЦ-активность, путем модификации константной области указанного антитела. Другой способ улучшения АЗКЦ-активности антитела представлен ферментативным изменением пути гликозилирования, что приводит к пониженным уровням фукозы. Существует несколько *in vitro* способов определения эффективности антител или эффекторных клеток для активации АЗКЦ. К ним относятся анализ высвобождения хрома-51 [Cr51], анализ высвобождения европия [Eu] и анализ высвобождения серы-35 [S35]. Обычно меченую целевую линию клеток, экспрессирующую определенный экспонируемый на поверхности антиген, инкубируют с антителом, специфическим в отношении указанного антигена. После промывания эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецептор CD16, коинкубируют с мечеными антителом целевыми клетками. Затем измеряют лизис целевых клеток по высвобождению внутриклеточной метки с помощью сцинтилляционного счетчика или спектрофотометрии.

Биспецифическое антитело согласно описанию в настоящем документе предпочтительно представляет собой антитело с усиленной АЗКЦ-активностью. Биспецифическое антитело может согласно одному аспекту быть афукозилированным. Биспецифическое антитело предпочтительно имеет пониженную степень фукозилирования N-связанной углеводной структуры в Fc-области по сравнению с тем же антителом, продуцированным в нормальной клетке СНО.

Антитело, которое содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, может дополнительно содержать один или более дополнительных переменных доменов, которые могут связывать одну или более дополнительных мишеней. Указанная дополнительная мишень предпочтительно представляет собой белок, предпочтительно мембранный белок, содержащий внеклеточную часть. Мембранный белок в настоящем документе представляет собой белок клеточной мембраны, такой как белок, расположенный во внешней мембране клетки, мембране, которая отделяет клетку от внешней среды. Указанный мембранный белок имеет внеклеточную часть. Мембранный белок находится на клетке, если он по меньшей мере содержит трансмембранную область, которая находится в клеточной мембране клетки.

В данной области техники известны антитела более чем с двумя переменными доменами. Например, возможно присоединение дополнительного переменного домена к константной части антитела. Антитело с тремя или более переменными доменами предпочтительно представляет собой мультивалентное мультимерное антитело согласно описанию в источнике PCT/NL2019/050199, который включен посредством ссылки в настоящий документ.

Согласно одному аспекту указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее два переменных домена, отличающихся тем, что один переменный домен связывает внеклеточную часть рЭФР, а другой переменный домен связывает внеклеточную часть LGR5. Указанные переменные домены предпочтительно представляют собой переменные домены согласно описанию в настоящем документе.

Функциональная часть антитела согласно описанию в настоящем документе содержит по меньшей мере переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, она содержит антигенсвязывающие части антитела согласно описанию в настоящем документе и, как правило, содержит переменные домены указанного антитела. Переменный домен функциональной части может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент или фрагмент так называемого однодоменного антитела. Фрагмент однодоменного антитела (sdAb) представляет собой фрагмент антитела с единственным мономерным переменным доменом антитела. Как и целое антитело, он способен селективно связываться со специфическим антигеном. Имеющие молекулярную массу всего 12–15 кДа фрагменты однодоменных антител имеют значительно меньший размер, чем обычные антитела (150–160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньший размер, чем Fab-фрагменты (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные переменные фрагменты (~25 кДа, два переменных домена, один из легкой цепи и один из тяжелой цепи). Размер собственно однодоменных антител не намного меньше, чем размер

нормальных антител (как правило, 90–100 кДа). Фрагменты однодоменных антител в основном конструируют из антител из тяжелых цепей, обнаруживаемых у верблюдовых; указанные антитела называют VHH-фрагментами (нанотела Nanobody®). У некоторых рыб также имеются антитела, состоящие только из тяжелых цепей (IgNAR, «иммуноглобулин с новым антигенным рецептором»),

5 из которого могут быть получены фрагменты однодоменных антител, называемые VNAR-фрагментами. Альтернативный подход заключается в расщеплении димерных переменных доменов из обычного иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Хотя в настоящее время большинство исследований однодоменных антител основано на переменных доменах тяжелых цепей, было показано, что и нанотела, происходящие из легких цепей, специфически

10 связываются с целевыми эпитопами. Неограничивающие примеры таких переменных доменов из частей антител представлены VHH, доменными антителами человека (dAb) и антителами «Unibody». Предпочтительные части или производные антител имеют по меньшей мере два переменных домена антитела или их эквивалента. Неограничивающие примеры таких переменных доменов или их эквивалентов представлены F(ab)-фрагментами и одноцепочечными

15 Fv-фрагментами. Функциональная часть биспецифического антитела содержит антигенсвязывающие части биспецифического антитела или производное и/или аналог указанных связывающих частей. Как упоминалось выше в настоящем документе, связывающая часть антитела входит в переменный домен.

Также предложены антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог

20 согласно описанию в настоящем документе (т.е. терапевтическое соединение) и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции подходят для лечения рака, в частности, для лечения рака головы и шеи. В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный правительственным контрольным органом или внесенный в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для применения у животных, в

25 частности, у человека, и включает любые растворители, соли, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антимикотические агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты, и т.п., которые физиологически совместимы. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или основе, с которыми вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и

30 масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло, глицерин-полиэтиленгликоль рицинолеат, и т.п. Вода или водный раствор, солевой раствор и водные растворы декстрозы и глицерина могут применяться в качестве носителей, в частности, для инъеклируемых растворов. Жидкие композиции для парентерального введения могут входить в

35 составы для введения путем инъекций или постоянной инфузии. Пути введения с применением инъекций или инфузии включают интравезикальный, внутриопухольный, внутривенный,

внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный и подкожный. В зависимости от пути введения (например, внутривенно, подкожно, внутрисуставно и т.п.) активное соединение может быть покрыто материалом для защиты указанного соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

5 Фармацевтические композиции, подходящие для введения пациентам-людям, как правило, вводят в составы для парентерального введения, например, в жидком носителе, или в составы, подходящие для приготовления жидкого раствора или суспензии для внутривенного введения. Указанные композиции могут быть получены в виде единичной дозированной формы для простого
10 введения и однородности дозирования. Также включены твердые составы, которые предназначены для преобразования, незадолго до применения, в жидкие составы для перорального или парентерального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии.

Описанное терапевтическое соединение может быть введено в соответствии с подходящей дозировкой и подходящим путем введения (например, внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный или подкожный). Например, может вводиться разовый болюс,
15 несколько разделенных доз на протяжении периода времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена исходя из требований терапевтической ситуации. Согласно одному варианту реализации субъекту вводят одну дозу антитела или его функциональной части, производного и/или аналога согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное терапевтическое соединение вводят
20 многократно, на протяжении курса лечения. Например, согласно некоторым вариантам реализации несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) доз указанного терапевтического соединения вводят субъекту, нуждающемуся в лечении. Согласно некоторым вариантам реализации введение терапевтического соединения может осуществляться еженедельно, один раз в две недели или ежемесячно. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению вводят один раз в две
25 недели.

Клинический специалист может использовать предпочтительные дозировки в зависимости от состояния пациента, лечение которого проводят. Доза может зависеть от ряда факторов, в том числе стадии заболевания и т.п. Определение конкретной дозы, которую следует вводить, на основании наличия одного более или таких факторов находится в пределах компетенции
30 специалиста в данной области техники. Обычно лечение начинают с более низких дозировок, которые меньше оптимальной дозы соединения. После этого дозировку понемногу увеличивают до тех пор, пока не будет достигнут оптимальный в существующих обстоятельствах эффект. Для удобства общую суточную дозу можно разделить и вводить по частям в течение дня, если требуется. Может также применяться прерывистая терапия (например, в течение одной недели из трех недель
35 или трех из четырех недель).

Согласно определенным аспектам терапевтическое соединение вводят в дозе 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела. Согласно другому варианту реализации указанное терапевтическое соединение вводят в дозе 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела.

Согласно предпочтительному аспекту терапевтические соединения (т.е. антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит 5 переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5), вводят субъекту в дозировке 1500 мг. Фиксированная дозировка имеет ряд преимуществ по сравнению с дозировкой, основанной на площади поверхности тела или массе тела, поскольку снижает продолжительность времени 10 приготовления и уменьшает потенциальные ошибки при расчете дозы. Согласно некоторым вариантам реализации указанное терапевтическое соединение предложено в дозировке, равной по меньшей мере 1100 мг, предпочтительно в дозировке 1100–2000 мг, более предпочтительно в дозировке 1100–1800 мг. Как будет понятно специалисту в данной области техники, доза может быть введена на протяжении периода времени. Например, доза может вводиться в/в, например, на 15 протяжении 1–6-часовой инфузии, предпочтительно, 2–4-часовой инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации указанное терапевтическое соединение вводят один раз каждые 2 недели. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фиксированные дозировки согласно описанию в настоящем документе подходят для применения у взрослых и/или у субъектов, масса тела которых составляет по меньшей мере 35 кг. Предпочтительно, указанный субъект болен раком 20 головы и шеи.

Согласно настоящему изобретению предложено применение схемы премедикации. Такая схема может применяться для снижения вероятности или тяжести инфузионной реакцией. Предпочтительно, вводят (например, перорально, внутривенно) стероид или кортикостероид (такой как дексаметазон) и/или антигистаминное средство, или антагонист H1 (такой как 25 дексхлорфенирамин, дифенгидрамин или хлорфенирамин), или медикамент для снижения выработки желудочного сока (такие как ранитидин) перед лечением с помощью антитела. Также может проводиться премедикация медикаментом для снижения, лечения или облегчения боли или жара, например, введение парацетамола или т.п.

Предпочтительная схема премедикации включает дексаметазон 20 мг (в/в), 30 дексхлорфенирамин 5 мг (в/в) или дифенгидрамин 50 мг (п/о) или хлорфенирамин 10 мг (в/в) и ранитидин 50 мг (в/в) или 150 мг (п/о) и парацетамол 1 г (в/в) или 650 мг (п/о).

Способ лечения, описанный в настоящем документе, как правило, продолжают использовать до тех пор, пока ведущий лечение пациента клинический специалист считает 35 указанный способ лечения эффективным, т.е. пока, по мнению специалиста, пациент откликается на лечение. Неограничивающие показатели, указывающие на то, что способ лечения эффективен,

могут включать что-либо одно или более из: снижения числа опухолевых клеток; ингибирования пролиферации опухолевых клеток; элиминация опухолевых клеток; выживаемости без прогрессирования; подходящего ответа от подходящего маркера опухоли (где это применимо).

5 Что касается частоты введения терапевтического соединения, специалист в данной области техники может определить подходящую частоту. Например, клинический специалист может принять решение вводить терапевтическое соединение относительно редко (например, один раз каждые две недели) и постепенно сокращать период между дозами в зависимости от переносимости пациентом. Примеры периодов времени, ассоциированных с курсом терапии в соответствии с

10 заявленным способом, включают: приблизительно одну неделю; две недели; приблизительно три недели; приблизительно четыре недели; приблизительно пять недель; приблизительно шесть недель; приблизительно семь недель; приблизительно восемь недель; приблизительно девять недель; приблизительно десять недель; приблизительно одиннадцать недель; приблизительно двенадцать недель; приблизительно тринадцать недель; приблизительно четырнадцать недель;

15 приблизительно пятнадцать недель; приблизительно шестнадцать недель; приблизительно семнадцать недель; приблизительно восемнадцать недель; приблизительно девятнадцать недель; приблизительно двадцать недель; приблизительно двадцать одну неделю; приблизительно двадцать две недели; приблизительно двадцать три недели; приблизительно двадцать четыре недели; приблизительно семь месяцев; приблизительно восемь месяцев; приблизительно девять месяцев;

20 приблизительно десять месяцев; приблизительно одиннадцать месяцев; приблизительно двенадцать месяцев; приблизительно тринадцать месяцев; приблизительно четырнадцать месяцев; приблизительно пятнадцать месяцев; приблизительно шестнадцать месяцев; приблизительно семнадцать месяцев; приблизительно восемнадцать месяцев; приблизительно девятнадцать месяцев; приблизительно двадцать месяцев; приблизительно двадцать один месяц; приблизительно

25 двадцать два месяца; приблизительно двадцать три месяца; приблизительно двадцать четыре месяца; приблизительно тридцать месяцев; приблизительно три года; приблизительно четыре года; приблизительно пять лет; пожизненно (например, постоянная поддерживающая терапия). Вышеупомянутая продолжительность может быть ассоциирована с одним или несколькими раундами/циклами лечения.

30 Эффективность способов лечения, предложенных согласно настоящему изобретению, может оцениваться с применением любых подходящих средств. Согласно одному варианту реализации клиническую эффективность лечения анализируют на основании снижения числа раковых клеток в качестве критерия объективного ответа. Пациенты, например, люди, получающие лечение в соответствии со способами согласно описанию в настоящем документе, предпочтительно

35 испытывают улучшение применительно по меньшей мере к одному признаку рака. Согласно некоторым вариантам может происходить что-либо одно или более из следующего: может снижаться число раковых клеток; рецидив рака предотвращается или задерживается; один или

более из симптомов, ассоциированных с раком, может до какой-то степени смягчаться. Кроме того, используют анализы *in vitro* для определения опосредованного Т-клетками лизиса целевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации оценка опухоли основана на КТ-сканировании и/или МРТ-сканировании, см., например, методические рекомендации RECIST 1.1 («Response Evaluation
5 Criteria in Solid Tumours», Критерии оценки ответа при солидных опухолях) (Eisenhauer et al., 2009 Eur J Cancer 45:228–247). Такие оценки обычно получают каждые 4–8 недель после лечения.

Согласно некоторым аспектам после лечения согласно описанию в настоящем документе опухолевые клетки больше не могут быть детектированы. Согласно некоторым вариантам реализации субъект находится в частичной или полной ремиссии. Согласно определенным аспектам
10 субъект характеризуется продленной общей выживаемостью, повышенными медианным уровнем выживаемости и/или выживаемостью без прогрессирования.

Терапевтическое соединение (т.е. антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5),
15 может также применяться в сочетании с другими хорошо известными вариантами терапии (например, химиотерапией или лучевой терапией), которые выбирают на основании их конкретной полезности при раке, лечение которого проводится.

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

Специалистам в данной области техники будет понятно, что введение
25 химиотерапевтического агента (агентов) и/или проведение лучевой терапии могут меняться в зависимости от заболевания, лечение которого проводится, и известных эффектов указанных химиотерапевтического агента (агентов) и/или лучевой терапии на это заболевание. Также, в соответствии с имеющимися у клинического специалиста знаниями, терапевтические протоколы (например, дозировка и время введения) могут меняться в зависимости от наблюдаемых у пациента
30 эффектов вводимых терапевтических агентов, и в зависимости от наблюдаемых откликов заболевания на вводимые терапевтические агенты.

Предпочтительно, субъект-человек соответствует любому или всем из следующих требований:

1. Подписанное информированное согласие до начала любых процедур исследования.

2. Возраст ≥ 18 лет на момент подписания информированного согласия.

3. Гистологически или цитологически подтвержденные солидные опухоли с признаками метастатического или местно-распространенного заболевания, не поддающиеся стандартной терапии с лечебной целью:

5 Типы не-CRC опухолей в когортах для расширения исследования: могут быть исследованы пациенты с распространенной или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи, с предварительным лечением или без предварительного лечения по меньшей мере 2 линиями стандартной одобренной терапии.

10 4. Исходный образец свежей опухоли (FFPE (фиксированный в формалине и залитый парафином) и, если материала достаточно, также и замороженный образец) из метастатического или первичного сайта.

5. Подходит для биопсии.

6. Поддающееся измерению радиологическими методами заболевание согласно RECIST версии 1.1.

15 7. Статус состояния 0 или 1 по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG, «Eastern Cooperative Oncology Group»).

8. Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 12 недель, по мнению исследователя.

9. Фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) $\geq 50\%$ по данным эхокардиограммы (ЭхоКГ) или многовходной артериографии (MUGA).

20 10. Адекватная функция органов:

- Абсолютное содержание нейтрофилов (АСН) $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$

- Гемоглобин ≥ 9 г/дл

- Тромбоциты $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$

25 • Скорректированное общее содержание кальция в сыворотке в пределах нормальных диапазонов

- Магний в сыворотке в пределах нормальных диапазонов (или скорректирован добавками)

30 • Аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ) $\leq 2,5 \times$ верхний предел нормы (ВПН) и общий билирубин $\leq 1,5 \times$ ВПН (если уровень не обусловлен известным наличием синдрома Жильбера, в этом случае пациента исключают при общем билирубине $> 3,0 \times$ ВПН или прямом билирубине $> 1,5 \times$ ВПН); при вовлечении печени допускается АЛТ/АСТ $\leq 5 \times$ ВПН и общий билирубин $\leq 2 \times$ ВПН, если уровень не обусловлен известным наличием синдрома Жильбера, в этом случае допускается общий билирубин $\leq 3,0 \times$ ВПН или прямой билирубин $\leq 1,5 \times$ ВПН, гепатоцеллюлярной карциномы [класса А по Чайлд-Пью], в этом случае допускается общий билирубин < 3 мг/мл

35 • Креатинин сыворотки $\leq 1,5 \times$ ВПН или клиренс креатинина ≥ 60 мл/мин, вычисленные по формуле Кокрофта-Голта или формуле MDRD для пациентов возрастом > 65 лет

- Сывороточный альбумин $> 3,3$ г/дл

Соединения и композиции, описанные в настоящем документе, подходят в качестве терапии и при терапевтическом лечении и могут, соответственно, быть полезны в качестве медикаментов и применяться в способе получения медикамента.

5 Все документы и ссылки, в том числе записи в Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, и веб-сайты, описанные в настоящем документе, явным образом включены в настоящий документ посредством ссылок в той же степени, как если бы они были полностью или частично приведены в настоящем документе.

10 Для ясности и краткости описания признаки описаны в настоящем документе как входящие в один и тот же вариант или в отдельные варианты реализации, однако следует понимать, что в объеме настоящего изобретения могут входить аспекты или варианты реализации, включающие комбинации всех или некоторых описанных признаков.

15 Настоящее изобретение описано ниже на приведенных примерах, которые являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения. Хотя настоящее изобретение и было описано подробно со ссылками на конкретные варианты его реализации, специалисту в данной области техники будет понятно, что в них могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от существа и объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

20 В настоящем документе «MFXXXX», где X представляет собой независимым образом число от 0 до 9, относится к Fab, содержащему переменный домен, отличающийся тем, что указанный VH имеет последовательность аминокислот, обозначаемую 4 цифрами, приведенную на фиг. 3. Если не указано иное, переменная область легкой цепи переменного домена, как правило, имеет последовательность, приведенную на фиг. 4b. Легкая цепь в примерах имеет последовательность, приведенную на фиг. 4a. «MFXXXX VH» относится к последовательности аминокислот VH, обозначаемую 4 цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи, которая обычно взаимодействует с константной областью легкой цепи. VH/переменные области тяжелых цепей отличаются, как и, как правило, CH3-области, при этом одна из тяжелых цепей имеет KK-мутацию в CH3-домене, а другая имеет дополняющую DE-мутацию в CH3-домене (см. PCT/NL2013/050294 (опубликована как WO2013/157954) и фиг. 5d и 5e). Биспецифические антитела в примерах имеют концевой Fc-фрагмент, который содержит KK/DE CH3-домен гетеродимеризации, CH2-домен и CH1-домен согласно фиг. 5, общую легкую цепь согласно фиг. 4a и VH, соответствующий номеру MF. Например, биспецифическое антитело, обозначенное MF3755×MF5816, имеет описанные выше общие последовательности и переменный домен с VH, имеющим последовательность MF3755, и 35 переменный домен с VH, имеющим последовательность MF5816.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот различных переменных областей тяжелых цепей (VH) представлены на фиг. 3. Биспецифические антитела к рЭФР/LGR5, MF3755×MF5816; содержащие переменные области тяжелых цепей MF3755 и MF5816 и общую легкую цепь и включающие модификации для усиления АЗКЦ благодаря афукозилированию, помимо других комбинаций LGR5 и рЭФР, представленные на фиг. 3, как было показано в WO2017/069628, являются эффективными.

Получение биспецифических антител

Биспецифические антитела получали путем транзientной котрансфекции двумя плазмидами, кодирующими IgG с разными VH-доменами, с применением проприетарной технологии конструирования CH3 для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифических антител. Также ту же клетку котрансфицировали общей легкой цепью, либо на той же плазмиде, либо на другой плазмиде. В заявках авторов настоящего изобретения (например, WO2013/157954 и WO2013/157953; включены в настоящий документ посредством ссылок) раскрыты способы и средства для получения биспецифических антител из единственной клетки, при этом предложены средства, которые способствуют образованию биспецифических антител, а не моноспецифических антител. Указанные способы могут также благоприятным образом применяться согласно настоящему изобретению. В частности, предпочтительные мутации для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG представлены заменами аминокислот в положениях 351 и 366, например, L351K и T366K (нумерация в соответствии с нумерацией EU) в первом CH3-домене («КК-вариант» тяжелой цепи), и заменами аминокислот в положениях 351 и 368, например, L351D и L368E, во втором CH3-домене («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот (см. фиг. 5d и 5e). Ранее в упомянутых заявках было продемонстрировано, что отрицательно заряженные DE-вариант тяжелой цепи и положительно заряженный КК-вариант тяжелой цепи преимущественно спариваются с образованием гетеродимеров (так называемые биспецифические молекулы «ДЕКК»). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DE-DE) или КК-варианта тяжелых цепей (гомодимеры КК-КК) почти никогда не происходит из-за выраженного отталкивания заряженных остатков интерфейса CH3-CH3 идентичных тяжелых цепей.

Гены VH переменного домена, который связывает LGR5, согласно описанию выше, клонировали в вектор, кодирующий положительно заряженный CH3-домен. Гены VH переменного домена, который связывает рЭФР, такие как описанные в WO 2015/130172 (включен в настоящий документ посредством ссылки), клонировали в вектор, кодирующий отрицательно заряженный CH3-домен. Адаптированные к росту в суспензии клетки 293F Freestyle культивировали во флаконах T125 на качающейся платформе до достижения плотности $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки высевали с плотностью, составляющей $0,3-0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в каждой лунке 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки транзientно

трансфицировали смесью двух плазмид, кодирующих разные антитела, клонированные в проприетарную векторную систему. Через семь дней после трансфекции клеточный супернатант собирали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм (Sartorius). Стерильный супернатант хранили при 4°C до очищения антител.

5 Очищение и количественное определение IgG

Очищение проводили в стерильных условиях в фильтрационных планшетах с применением аффинной хроматографии с белком А. Сначала значение pH среды доводили до pH 8,0, а затем содержащие IgG супернатанты инкубировали с сефарозными гранулами с белком А CL-4В (50% по объему) (Pierce) в течение 2 часов при 25°C на качающейся платформе при 600 об/мин. Затем гранулы собирали путем фильтрации. Гранулы двукратно промывали ФСБ pH 7,4. Затем связанный IgG элюировали при pH 3,0 0,1 М цитратным буфером и элюат немедленно нейтрализовали с применением Tris pH 8,0. Выполняли замену буфера путем центрифугирования с применением многолуночных планшетов Multiscreen Ultracel 10 (Millipore). Наконец, образцы собирали в ФСБ с pH 7,4. Концентрацию IgG измеряли с применением Octet. Образцы белка хранили при 4°C.

15 Для определения количества очищенного IgG определяли концентрацию антитела с применением анализа Octet с биосенсорами с белком А (Forte-Bio, в соответствии с рекомендациями поставщика), используя тотального IgG человека (Sigma Aldrich, кат.№ I4506) в качестве стандарта.

Следующие биспецифические антитела подходят для применения в указанном примере и для применения в способах согласно настоящему изобретению: MF3370×MF5790, MF3370×5803, 20 MF3370×5805, MF3370×5808, MF3370×5809, MF3370×5814, MF3370×5816, MF3370×5817, MF3370×5818, MF3755×MF5790, MF3755×5803, MF3755×5805, MF3755×5808, MF3755×5809, MF3755×5814, MF3755×5816, MF3755×5817, MF3755×5818, MF4280×MF5790, MF4280×5803, MF4280×5805, MF4280×5808, MF4280×5809, MF4280×5814, MF4280×5816, MF4280×5817, MF4280×5818, MF4289×MF5790, MF4289×5803, MF4289×5805, MF4289×5808, MF4289×5809, 25 MF4289×5814, MF4289×5816, MF4289×5817 и MF4289×5818. Каждое биспецифическое антитело содержит два VH, соответствующих номерам в названии MF, способных к связыванию рЭФР и LGR5, соответственно, и дополнительно содержит концевой Fc-фрагмент с KK/DE CH3-доменом гетеродимеризации, согласно SEQ ID NO: 136 (фиг. 5d) и SEQ ID NO: 138 (фиг. 5e), соответственно, домен CH2 согласно SEQ ID NO: 134 (фиг. 5c) и домен CH1 согласно SEQ ID NO: 131 (фиг. 5a), 30 общую легкую цепь согласно SEQ ID NO: 121 (фиг. 4).

Примеры 1: In vivo оценка антитела против рЭФР × против LGR5 при раке головы и шеи с применением моделей на мышах на основе полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX)

PDX-модели на мышах

В Crown Biosciences Inc. была разработана серия моделей на основе полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX), происходящих из хирургически извлеченных первичных опухолей человека. PDX-модели в настоящем документе имеют клинические и молекулярные аннотации и достоверно представляют клиническую эпидемиологию соответствующих опухолей.

- 5 Указанные модели могут быть инъецированы подкожно в боковую область мышам с иммунодефицитом. Разные PDX-модели рака головы и шеи были использованы для оценки терапевтической эффективности полноразмерного биспецифического антитела IgG1, содержащего MF3755×MF5816 и дополнительные релевантные домены согласно описанию (т.е. CH1, CH2, модифицированный KK/DE CH3-домен гетеродимеризации и общую легкую цепь). Подробная информация об указанных моделях, в том числе подтипах рака, присутствии геномных мутаций и уровнях экспрессии рЭФР/LGR5 приведена в таблице 1.

Таблица 1: Характеристики PDX-моделей, происходящих от пациентов с раком головы и шеи.

Экспрессию LGR5 и рЭФР определяли путем РНК-секвенирования (RNAseq).

- 15 Мутационный статус определяли с применением геномного анализа. ПКГШ = плоскоклеточная карцинома головы и шеи; АДК: аденокарцинома; МТ = масса тела, ФРКМ = нормирование на основе числа фрагментов на килобазу в модели экзона на млн картированных ридов.

№ модели рака головы и шеи (HN)	Подтип, вовлеченные ткань/ орган	Мутации	Примечания	Экспрессия рЭФР		Экспрессия LGR5	
				Кратность	LOG2 (ФРКМ)	Кратность	LOG2 (ФРКМ)
		* = стоп X = сдвиг рамки					
2167	ПКГШ, гортань	CDKN2A (RAGAR99-103X), CREBBP (R1446C), CUL1 (D483N), EPHA3 (S899L), EXT1 (R723S), FAT2 (G2421C), FOXP1 (E581K), HIST1H3B (R50P), HSP90AB1 (R456P), IKZF3 (A311T), IL6ST (Y554F), INHBA (R309L), LMO1 (D47Y), LPP (M504K), MSRI (E107*), NBN (E564K), RAD54B (N593S), RGS3 (R1040Q), TAOK1 (R504C), TP53 (R273C), WNK1 (Y2276*)	-	0,081882332	6,32	0,001298314	2,5422
2590	ПКГШ, язык	AHR (Q173E), AHR (E211Q), ALK (T917I),	Изызвление	0,09062486	6,1562	1,70936E-05	-2

		ATФ6АР2 (S163C), CDKN2A (D84Y), EP300 (S1730C), FGFR1 (R506Q), FLT4 (P1008L), FN1 (R1496W), HLA-B (118-119:TL/TX), IREB2 (G747E), MCM8 (G655V), PLCG2 (R956H), RB1 (E884K), THRAP3 (S278C), TP53 (G245S), WNK1 (724-725:-/X), YBX1 (E6K), ZNF638 (вариант акцептора сплайсинга)					
2579	ПКГШ, слизистая оболочка щеки	DCC (P110L), DLC1 (R595C), HRAS (G12S), LZTS1 (E505K), SMARCA4 (R1135Q), WRN (K32R)	Незначительная потеря МТ	0,072662887	6,3068	3,88965E-05	-2
5124	ПКГШ	APC (R2505Q), ERCC6 (G952D), MAD1L1 (K349M), ROS1 (S653F),	-	0,086109606	5,5114	6,1608E-05	-2
3164	АДК, околоушная железа	DLC1 (D1180N), ERHA4 (P505S), KIAA1549 (E1426K), MAP2K1 (L375R), MSH3 (R411H), TP53 (Y234C)	-	0,037884885	3,5721	0,162565065	4,4409
5125	ПКГШ, шея	ATM (S1383L), ECT2L (Q743*), HLA-B (118-119:TL/TX), HLA-B (E69DX), ITGA9 (R108W), RB1 (R445*), RGS3 (R1157L), SOX17 (L156P), TP53 (R337C)	-	0,033023866	5,6525	5,32958E-05	-2
3411	ПКГШ, гортань	ERHA2 (T511M), MACF1 (N2198Y), CUL3 (T467M), TFEB (V130M), NOTCH1 (R2087W), EFTUD2 (R785Q), SOX9 (D85N), ARFGAP3 (S317L), SETD2 (LSK655-657X), ATR (R109W), HLA-B (E69DX), PGR (G580S), WNK1 (724-725X), TP53 (QHLIR192-196R),		0,066758808	5,3232	0,025256736	2,4983

3642	ПКГШ, кожа шеи с правой стороны	EPHA2 (G391R), AHCTF1 (S880Y), EPHA4 (R514Q), FAT1 (L3925S), (K2988I), FAT1 (Q2775*), FAT1 (I1069M), FAT2 (I2501T), CDKN2A (R58*), FANCC (E213K), HSP90AA1 (V597F), CHD9 (R1481W), CBFB (R35W), TP53 (299-300X), TP53 (I251N), NF1 (G2502*), EFTUD2 (N596S), BCL3 (V284M), ASXL1 (Q925*), ARFGAP1 (V184M), PLXNB2 (S366L), TAF1 (S1020F), CSF3R (S130F), LRP1B (G1637R), EPHA3 (S532F), MAP3K13 (D887V), HLA-B (TL118-119TX), HLA-B (E69DX), HDAC9 (E789K), LEP (P64L), DLC1 (S1116L), NOTCH1 (G367S), KIF5B (P163L), KIF5B (P163S), STARD13 (L790F), ARID4A (H411D), MYH10 (R169C), BRWD1 (D408N), CLTCL1 (R221C), PLXNB2 (R1578C), SMARCA1 (R275C)		0,086296399	5,3407	0,012482772	2,3309
------	---------------------------------	---	--	-------------	--------	-------------	--------

Инокуляция опухолей и рандомизация

Свежую опухолевую ткань для инокуляции брали у мышей, несущих развившиеся первичные опухоли человека. Свежие опухоли разрезали на небольшие фрагменты (приблизительно 2–3 мм в диаметре) и трансплантировали мышам подкожно в верхний дорсальный боковой участок справа. Фрагменты опухолей инокулировали 6–8-недельным самкам мышей BALB/c Nude или NOD/SCID со средней массой тела приблизительно 16–20 граммов. После достижения опухолями среднего размера 100–150 мм³, мышей рандомизировали. В общей сложности в исследование было включено по 16 мышей на модель (4 контрольных мыши и 12 мышей, получавших лечение антителом). Рандомизацию осуществляют на основе метода «парного

распределения» (программное обеспечение StudyDirector™, версия 3.1.399.19). Контрольные мыши получали ФСБ.

Схема лечения и взятия образцов

Первый раз лечение проводили в день рандомизации, который считают днем 0 эксперимента. Всем мышам инъецировали внутривентриально (в/б) один раз в неделю на протяжении 6 недель, используя инъекционный объем 200 мкл с дозой, свежеприготовленной перед дозированием из стокового раствора антитела 20 мг/мл. Контрольные мыши получали ФСБ, а получавшим лечение антителом мышам вводили дозу в скорректированном по массе тела объеме дозирования (объем дозирования = 10 мкл/г). Каждая мышь получала 0,5 мг антитела (примерно 25 мг/кг) независимо от массы тела, согласно подробному описанию в таблице 2. После окончания периода лечения все мыши обязательно проходили 3-недельный период наблюдения. Период наблюдения продлевали, если опухоли не дорастали до максимального этически допустимого размера. Контрольным мышам инъецировали ФСБ, используя такой же инъекционный объем.

Таблица 2: План лечения

15 QW = один раз в неделю, ROA = путь введения, в/б = внутривентриально.

Группа	№ животного	Лечение	Уровень дозы (мг/кг)	ROA	Дозировка в растворе (мг/мл)	Объем дозы (мл/кг)	Частота и продолжительность дозирования
1	4	Основа	-	в/б	-	10	QW × 6 недель
2	4	Антитело	25	в/б	2,5	10	QW × 6 нед.

Наблюдение, взятие образцов и сбор данных

После инокуляции опухолей заболеваемость и смертность у животных проверяли ежедневно. В ходе рутинного мониторинга животных обследовали для обнаружения каких-либо эффектов роста опухоли, изменений поведения, изменений подвижности, потребления пищи и воды, увеличения/снижения массы тела (массу тела измеряют два раза в неделю после рандомизации), потускнение глаз/шерсти и любых других аномалий. Регистрировали смертность и наблюдаемые клинические признаки у индивидуальных животных.

Объемы опухолей измеряли два раза в неделю после рандомизации в двух измерениях с применением калипера, и выражали объем в мм³, используя формулу: $V = (L \times W \times W)/2$, где V – объем опухоли, L – длина опухоли (наибольший линейный размер опухоли), а W – ширина опухоли (наибольший линейный размер опухоли в перпендикулярной L плоскости). Значения массы тела и объема опухолей регистрировали с помощью программного обеспечения StudyDirector™ (версия 3.1.399.19). Мышей умерщвляли в конце 9 недели или после достижения гуманной конечной точки (например: объема опухоли более 2000 мм³ или снижения массы тела более чем на 15% относительно исходной массы тела), в зависимости от того, что произошло раньше.

Результаты

Из протестированных PDX-моделей рака головы и шеи в семи из семи протестированных случаев плоскоклеточной карциномы головы и шеи лечение с помощью биспецифического антитела показало терапевтическую эффективность на протяжении периода исследования (фиг. 6).

5 Также в трех моделях наблюдался значимо сниженный рост опухолей. Модели HN2167 и HN2590 продемонстрировали меньший объем опухоли в конце периода наблюдения относительно начала лечения, что предполагает ингибирование опухоли, опосредованное биспецифическим антителом, при раке головы и шеи. Мыши в моделях HN2579, HN5124, HN3642, HN3411 и HN5125 также хорошо откликнулись на лечение антителом и демонстрировали уменьшение объема опухоли по сравнению с получавшими основу мышами.

Статистический анализ

Для сравнения объемов опухолей в разных группах в заранее заданный день сначала использовали критерий Бартлетта для подтверждения предположения об однородности дисперсии во всех группах. В случае, если р-значение для критерия Бартлетта $\geq 0,05$, проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для тестирования общего равенства средних значений во всех группах. В случае, если р-значение для однофакторного ANOVA $< 0,05$, использовали дополнительный апостериорный критерий, проводя HSD-тесты (достоверно значимого различия) Тьюки для всех попарных сравнений, и тесты Даннетта для сравнения каждой из групп лечения с группой основы. В случае, если р-значение для критерия Бартлетта $< 0,05$, использовали критерий Краскела-Уоллиса для тестирования общего равенства медианных значений во всех группах. Если р-значение для критерия Краскела-Уоллиса $< 0,05$, использовали дополнительный апостериорный критерий, проводя непараметрический тест Коновера для всех попарных сравнений или для сравнения каждой из групп лечения с группой основы, в обоих случаях с одношаговой корректировкой р-значений. Все статистические анализы выполняют в R — языке и среде для статистических вычислений и построения графиков (версия 3.3.1). Все тесты являются двусторонними, если не указано иное, и р-значения $< 0,05$ считают соответствующими статистической значимости.

Пример 2: Расширение применения установленной дозы и эффективность антитела против рЭФР × против LGR5 у пациентов с раком головы и шеи:

30 **Исследование фазы 1 с увеличением дозы при распространенных солидных опухолях**
Дизайн исследования

Проводили открытое многоцентровое исследование фазы 1, включающее начальную часть с увеличением дозы для определения рекомендованной для фазы 2 дозы (RP2D) биспецифического антитела против рЭФР × против LGR5 согласно настоящему описанию для солидных опухолей у пациентов с mCRC при стартовой фиксированной дозе 5 мг. После установления RP2D антитело дополнительно анализируют в ходе части исследования с расширением применения, в том числе

применения у пациентов, у которых диагностирован рак головы и шеи. У всех пациентов определяют характеристики безопасности, ФК, иммуногенности и предварительной противоопухолевой активности антитела, и проводят анализ биомаркеров, в том числе статуса pЭФР и LGR5.

5 Критерии включения

Для включения в исследование пациенты должны соответствовать всем нижеследующим требованиям:

1. Подписанное информированное согласие перед началом любых процедур исследования.
2. Возраст ≥ 18 лет на момент подписания информированного согласия.

- 10 3. Гистологически или цитологически подтвержденные солидные опухоли с признаками метастатического или местно-распространенного заболевания, не поддающиеся стандартной терапии с лечебной целью:

Типы не-CRC опухолей в когортах для расширения исследования: могут быть исследованы пациенты с распространенной или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи, с предварительным лечением или без предварительного лечения по меньшей мере 2 линиями стандартной одобренной терапии.

4. Исходный образец свежей опухоли (FFPE (фиксированный в формалине и залитый парафином) и, если материала достаточно, также и замороженный образец) из метастатического или первичного сайта.

- 20 5. Подходит для биопсии.

6. Поддающееся измерению радиологическими методами заболевание согласно RECIST версии 1.1.

7. Статус состояния 0 или 1 по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG, «Eastern Cooperative Oncology Group»).

- 25 8. Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 12 недель, по мнению исследователя.

9. Фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) $\geq 50\%$ по данным эхокардиограммы (ЭхоКГ) или многофазной артериографии (MUGA).

10. Адекватная функция органов:

- Абсолютное содержание нейтрофилов (АСН) $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$

- 30 • Гемоглобин ≥ 9 г/дл

- Тромбоциты $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$

• Скорректированное общее содержание кальция в сыворотке в пределах нормальных диапазонов

- Магний в сыворотке в пределах нормальных диапазонов (или скорректирован добавками)

- 35 • Аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ) $\leq 2,5 \times$ верхний предел нормы (ВПН) и общий билирубин $\leq 1,5 \times$ ВПН (если уровень не обусловлен известным

наличием синдрома Жильбера, в этом случае пациента исключают при общем билирубине $>3,0 \times$ ВПН или прямом билирубине $>1,5 \times$ ВПН); при вовлечении печени допускается АЛТ/АСТ $\leq 5 \times$ ВПН и общий билирубин $\leq 2 \times$ ВПН, если уровень не обусловлен известным наличием синдрома Жильбера, в этом случае допускается общий билирубин $\leq 3,0 \times$ ВПН или прямой билирубин $\leq 1,5 \times$ ВПН, или гепатоцеллюлярной карциномы [класса А по Чайлд-Пью], в этом случае допускается общий билирубин <3 мг/мл

- Креатинин сыворотки $\leq 1,5 \times$ ВПН или клиренс креатинина ≥ 60 мл/мин, вычисленные по формуле Кокрофта-Голта или формуле MDRD для пациентов возрастом >65 лет

- Сывороточный альбумин $>3,3$ г/дл

10 Критерии исключения

При соответствии любому из нижеследующих признаков пациента исключают из участия в исследовании:

1. Метастазы в центральную нервную систему, лечение которых не проводится, или которые являются симптоматическими, или требуют лучевой терапии, хирургического вмешательства или непрерывной стероидной терапии для контроля симптомов, в течение 14 дней после включения в исследование.

2. Известное вовлечение мягкой и паутинной оболочек мозга.

3. Участие в другом клиническом испытании или лечение любым экспериментальным лекарственным средством в пределах 4 недель до включения в исследование.

4. Любая системная противораковая терапия в пределах 4 недель или 5 периодов полужизни, в зависимости от того, что из этого длительнее, от введения первой дозы в рамках исследуемого лечения. Для цитотоксических агентов, имеющих выраженную отсроченную токсичность (например, митомицин С, нитрозомочевины), или противораковой иммунотерапии необходим период отмывки 6 недель.

5. Потребность в иммуносупрессивном медикаменте (например, метотрексате, циклофосфамиде)

6. Обширное оперативное вмешательство или радиационная терапия в пределах 3 недель от введения первой дозы в рамках исследуемого лечения. Пациенты, ранее получавшие лучевую терапию на $\geq 25\%$ костного мозга, не подходят для включения в исследование, независимо от того, когда эта терапия была проведена.

7. Персистирующая клинически значимая токсичность >1 степени, связанная с предшествующей антинеопластической терапией (за исключением алопеции); стабильная сенсорная нейропатия ≤ 2 степени по шкале NCI-CTCAE v4.03 допустима.

8. Наличие в анамнезе реакции гиперчувствительности или любой чувствительности с установленной связью с белками человека или с любыми из вспомогательных веществ, которая потребовала окончательного прекращения применения указанных агентов.

9. Неконтролируемая гипертензия (систолическая > 150 мм рт.ст. и/или диастолическая > 100 мм рт.ст.) при адекватном лечении, или нестабильная стенокардия.

10. Наличие в анамнезе застойной сердечной недостаточности класса II-IV по критериям Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), или серьезной сердечной аритмии, требующей лечения (за исключением мерцательной аритмии, пароксизмальной наджелудочковой тахикардии).

11. Наличие в анамнезе инфаркта миокарда в пределах 6 месяцев от включения в исследование.

12. Наличие в анамнезе предшествующих злокачественных новообразований, за исключением хирургически удаленного интраэпителиального новообразования шейки матки или немеланомного рака кожи, или излеченного рака с низким риском рецидива без признаков заболевания в течение по меньшей мере 3 лет.

13. Наличие диспноэ в покое любого происхождения, или другие заболевания, требующие постоянной кислородной терапии.

14. Пациенты с интерстициальным заболеванием легких в анамнезе (например, пульмонитом или фиброзом легких) или признаками ИЗЛ при исходном КТ-сканировании органов грудной клетки.

15. Текущее серьезное заболевание или медицинские состояния, включающие, без ограничения перечисленным, неконтролируемую активную инфекцию, клинически значимые легочные, метаболические или психиатрические расстройства.

16. Активная инфекция ВИЧ, ВГВ или ВГС, требующая лечения.

17. Пациенты с текущим статусом цирроза по Чайлд-Пью класса В или С; известная фибролампеллярная ГЦК, саркоматоидная ГЦК или смешанная холангиокарцинома и ГЦК

18. Беременные или кормящие женщины; способные к деторождению пациенты должны использовать высокоэффективные способы контрацепции до включения в исследование, на протяжении участия в исследовании и на протяжении 6 месяцев после получения последней дозы антитела.

Увеличение дозы

В части исследования с увеличением дозы лечение получают пациенты с метастатической аденокарциномой ободочной и прямой кишки (mCRC), ранее получавшие для лечения метастатического рака стандартную одобренную терапию, включающую оксалиплатин, иринотекан и фторпиримидин (5-FU и/или капецитабин), с антиангиогенными средствами или без них, и антитело против рЭФР для RASwt с KRAS и NRAS дикого типа.

Получали ФК-модель на основе доступных данных о концентрации биспецифического антитела в сыворотке из предварительных и соответствующих GLP токсикологических исследований на яванских макаках. После аллометрического масштабирования указанную модель использовали для предсказания воздействия антитела у человека. Стартовая доза антитела

составляла 5 мг (фиксированная доза) в/в, каждые 2 недели, в 4-недельных циклах. Исследуют до 11 уровней дозы: 5, 20, 50, 90, 150, 225, 335, 500, 750, 1100 и 1500 мг (фиксированная доза). Введенная доза, прирост дозы и частота дозирования для каждого пациента и каждой когорты могут быть изменены исходя из соображений безопасности пациента, на основании данных ФК и ФД, однако доза не должна превышать 4500 мг на цикл.

Дозолимитирующая токсичность (ДЛТ)

Любой из следующих видов клинической токсичности и/или лабораторных аномалий, возникший в первом цикле (28 дней), который исследователь сочтет связанным с лечением антителом, считается ДЛТ:

10 Гематологическая токсичность:

— Нейтропения 4 степени (абсолютное содержание нейтрофилов [АСН] $< 0,5 \times 10^9$ клеток/л) а протяжении ≥ 7 дней

— Фебрильная нейтропения 3–4 степени

— Тромбоцитопения 4 степени

15 — Тромбоцитопения 3 степени, ассоциированная с эпизодами кровотечений

— Другая гематологическая токсичность 4 степени

— Негематологические НЯ и лабораторная токсичность 3–4 степени, за исключением:

— Инфузионные реакции 3–4 степени

— Токсичность для кожи 3 степени, которая восстанавливается до ≤ 2 степени в течение

20 2 недель при оптимальном лечении.

— Диарея, тошнота и/или рвота 3 степени, которые восстанавливаются до ≤ 1 степени или до исходного уровня в течение 3 дней при оптимальном лечении

— Электролитные аномалии 3 степени, которые разрешаются при оптимальном лечении в течение 48 часов

25 — Аномалии печени 3–4 степени продолжительностью ≤ 48 часов

— Любые аномалии функции печени, отвечающие определению закона Хая.

— Любая токсичность, связанная с лекарственным средством, длящаяся ≥ 15 дней, которая предотвращает два последующих введения.

Расширение применения установленной дозы

30 В части с расширением применения установленной дозы биспецифическое антитело согласно настоящему описанию вводят в дозе RP2D пациентам с раком головы и шеи. После определения RP2D дополнительные пациенты получают лечение указанной дозой по указанной схеме для получения дополнительных характеристик безопасности, переносимости, ФК и иммуногенности антитела, и для получения предварительной оценки противоопухолевой

35 активности и анализа биомаркеров. Известно, что злокачественные новообразования, подлежащие

лечению, коэкспрессируют обе мишени (т.е. LGR5 и рЭФР) и могут предварительно быть оценены как чувствительные к ингибированию рЭФР.

Лечение антителом у пациентов с раком головы и шеи исследуют, например, на 10–20 пациентах для каждого показания, с потенциальным расширением до 40 пациентов, в зависимости от признаков предварительной противоопухолевой активности). Безопасность RP2D постоянно оценивается Комитетом по мониторингу безопасности в ходе части исследования с расширенным применением. Если частота ДЛТ превышает заранее заданный пороговый уровень 33% для любой когорты, включение в исследование приостанавливают для указанной когорты, и Комитет по мониторингу безопасности проводит полный анализ безопасности, ФК и биомаркеров, чтобы определить, безопасно ли продолжать увеличение этой когорты. В указанный период также исследуется общая безопасность лекарственно средства.

Экспериментальная терапия и схема терапии

Биспецифическое антитело против рЭФР × против LGR5 вводят в состав в форме прозрачного жидкого раствора для в/в инфузии. В/в инфузию осуществляют каждые 2 недели с применением стандартных инфузионных процедур, при стартовой дозе 5 мг (фиксированная доза), и рекомендованной дозе фазы 2 1500 мг (фиксированная доза). Увеличение дозы прекращали при достижении RP2D. Инфузии необходимо проводить как минимум за 4 часа в цикле 1. Продолжительность последующих инфузий после цикла 1 может быть сокращена до 2 часов по усмотрению исследователя и в отсутствие инфузионных реакций (ИР).

Премедикация

Во время цикла 1 все инфузии проводят на протяжении периода по меньшей мере 4 часа при следующей схеме премедикации: за 24 часа до начала инфузии вводят 8 мг дексаметазона п/о; за 1 час до начала инфузии каждый пациент получает 20 мг дексаметазона в/в, 5 мг дексхлорфенирамина в/в, или 50 мг дифенгидрамина п/о, или 10 мг хлорфенирамина в/в, 50 мг ранитидина в/в или 150 мг п/о; и 1 г парацетамола в/в или 650 мг п/о.

Если пациент переносит все инфузии цикла 1 без ИР, и исследователь считает это приемлемым, пациент может продолжить получать дополнительные инфузии антитела без сопутствующей премедикации дексаметазоном, а продолжительность инфузий может быть сокращена до 2 часов. В таких случаях продолжительность инфузий может быть снова увеличена до ~4 часов, если это будет сочтено нужным, чтобы избежать или снизить частоту или тяжесть ИР. При первой инфузии антитела (день 1 цикла 1) каждого пациента наблюдают в течение 6 часов после начала инфузии и в течение 4 часов после начала второй инфузии. Впоследствии пациентов наблюдают на протяжении последующих введений (как минимум в течение 2 часов).

За один цикл принимают 4 недели. Для каждого пациента использовали 6-часовой период наблюдения после начала инфузии при первой инфузии антитела, 4-часовой период для второй инфузии и как минимум 2-часовой период для всех последующих введений, соответствующий по меньшей мере продолжительности инфузии. Антитело вводили путем 2–4-часовой в/в инфузии каждые 2 недели в 4-недельных циклах. День 1 следующего цикла соответствовал дню 29 предыдущего цикла, или дню после восстановления при каких-либо нежелательных явлениях, ассоциированных с предыдущим циклом.

Продолжительность лечения

Исследуемое лечение проводят до подтвержденного прогрессирования заболевания (согласно RECIST 1.1), неприемлемой токсичности, отзыва согласия, отсутствия комплаентности у пациента, решения исследователя (например, при клиническом ухудшении) или прерывания введения антитела более чем на 6 последовательных недель. Пациенты находятся под наблюдением для исследования безопасности в течение по меньшей мере 30 дней после последней инфузии антитела и до восстановления или стабилизации после каких-либо связанных с лечением видов токсичности, и для исследования прогрессирования заболевания и статуса выживаемости в течение 12 месяцев.

Оценки эффективности

Оценка опухолей основана на КТ/МРТ с контрастом согласно шкале RECIST 1.1 (Eisenhauer et al., 2009 Eur J Cancer 45:228–247), каждые 8 недель после начала лечения. Объективные ответы должны быть подтверждены по меньшей мере через 4 недели после первого наблюдения. Остеосцинтиграфию проводят при наличии клинических показаний у пациентов с метастазами в кости при включении в исследование или при подозрении на наличие очагов поражения в период исследования. Оценку циркулирующих в кровотоке опухолевых маркеров, в том числе карциноэмбрионального антигена (КЭА), проводят при скрининге и в 1 день каждого цикла.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5, для применения в лечении рака головы и шеи у субъекта, при этом указанное применение включает обеспечение указанного субъекта фиксированной дозой 1500 мг указанного антитела или его функциональной части, производного и/или аналога.
2. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 1, где указанный субъект представляет собой субъекта-человека.
3. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанное антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог применяют внутривенно.
4. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточный рак или аденокарциному.
5. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточный рак.
6. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный рак головы и шеи представляет собой рак носоглотки, рак гортани, гипофарингиальный рак, рак носовой полости, рак околоносовых пазух, рак полости рта и рак ротоглотки.
7. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточный рак ротоглотки.
8. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный рак головы и шеи имеет одну или более мутаций в пути LGR5 и/или в пути рЭФР, присутствующих в моделях, выбранных из HN5124, HN5125, HN2579, HN2590 и HN2167.

9. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный раб характеризуется экспрессией LGR5 и/или рЭФР.

5 10. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где VH-цепь вариабельного домена, который связывает рЭФР, содержит последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанную на фиг. 3; или последовательность аминокислот VH-цепи MF3755, показанную на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, включая инсерции, делеции, замены или комбинацию перечисленных модификаций относительно указанной VH; и при этом VH-цепь вариабельного домена, который связывает LGR5, содержит последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанную на фиг. 3; или последовательность аминокислот VH-цепи MF5816, показанную на фиг. 3, имеющую самое большее 15, предпочтительно не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и предпочтительно имеющую не более 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, включая инсерции, делеции, замены или комбинацию перечисленных модификаций относительно указанной VH.

11. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный вариабельный домен, который связывает LGR5, связывает эпитоп, локализованный в пределах остатков аминокислот 21–118 последовательности LGR5 человека, показанной на фиг. 1.

12. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 11, где остатки аминокислот в положениях 43, 44, 46, 67, 90 и 91 LGR5 человека вовлечены в связывание связывающего LGR5 вариабельного домена с LGR5.

13. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 11 или 12, где указанный связывающий LGR5 вариабельный домен в меньшей степени связывается с белком LGR5, содержащим один или более вариантов остатков аминокислот, выбранных из 43A, 44A, 46A, 67A, 90A и 91A.

14. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанный вариабельный домен, который связывает рЭФР, связывает эпитоп, локализованный в пределах остатков аминокислот 420-480 последовательности рЭФР человека, показанной на фиг. 2.

15. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения по п. 14, где остатки аминокислот в положениях I462, G465, K489, I491, N493 и C499 рЭФР человека вовлечены в связывание связывающего рЭФР переменного домена с рЭФР.

5 п. 14 или 15, где указанный связывающий рЭФР переменный домен в меньшей степени связывается с белком рЭФР, содержащим один или более вариантов замен остатков аминокислот, выбранных из I462A, G465A, K489A, I491A, N493A и C499A.

10 17. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов где указанное антитело представляет собой антитело с усиленной АЗКЦ-активностью.

18. Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог для применения в соответствии с любыми из предшествующих пунктов, где указанное антитело является афукозилированным.

15 19. Способ лечения рака головы и шеи, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которое (которая/который) содержит переменный домен, который связывает внеклеточную часть рЭФР, и переменный домен, который связывает внеклеточную часть LGR5.

Фиг. 1

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ SEQ ID NO: 1

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

Фиг. 2

Последовательность Seq ID NO: 2

```

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

APQSS EFIGA

```


Фиг. 3 а)

SEQ ID NO:	MF	Мишень	VH
3	3370	pЭФР	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQ GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRHWHWWLDAFDYWGQGLTLTVSS
4	3755	pЭФР	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNWVRQAPGHGLEWMGWINANTGDPTYAQGF TGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHFDYWGQGLTLTVSS
5	4280	pЭФР	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEYGKTTFFAQNF QGRVTMTEDTSA DTAYMELSSLRSED TAVYYCATEGYYETTTYYYNLFD SWGQGLTLTVSS
6	4289	pЭФР	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTF TDYAMTWVRQAPGQGLEWMGWITNTGDPTYAPGFT GRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYHWIRGF EFWGQGLTLTVSS
7	5790	LGR5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSFSSSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYYNPSLKS RVTISEDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQTYSSSWDGVLYYFDYWGQGLTLTVSS
8	5803	LGR5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNNGSISTYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYTGRTKYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARGGIVVPAARDY YYYMDVWVGKGT TVTVSS
9	5805	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKGSGFSFTSHWIGWVRQKPGRGLEWMGVIYPGDS DTRYSPSFQG QVTVSADKSINTAYLQWNSLKASDTAIYYCARPNSGSPRYFEFWGRGTLTVTVSS

Фиг. 3 а), продолжение

10	5808	LGR5	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQEYYYGSGSPSYFDYWGQGTLVTVSS
11	5809	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGDSFISHWIAWVRQMPGKGLEWMGIVYPGDS TRYSPSFQG QVTISADKSIT TAYLQWSSLKASDTAMY YCARHEWELLGPFDYWGQGTLVTVSS
12	5814	LGR5	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTSTND AISWVRQTPGQGLEWMGSIIPILD TTDHAQKFQG RVTITADKSTNTAYMELNSLRSDDTAVYYCAREHIAARQDYFDYWGQGTLVTVSS
13	5816	LGR5	EVQLVQSGSKLKKPGASVKV SCKASGYTF TSYTMNWVRQAPGQGLEWMGWINTDTGDPT YAQGGFT GRFVFLDTSVST AFLQINSLKAEDTAVYYCARGDCDSTSCYRYSYGYEDYWGQGTLVTVSS
14	5817	LGR5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKVSGGTFRSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFDTRNYAQILQGR VTITADLSTSTAYMELNSLRSEDTAIYYCARGSDEGDWFDWPWGQGTLVTVSS
15	5818	LGR5	EVQLVQSGTEVRKPGSSVKV SCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIIPILGT TDHAQKFQD RVTITADKSSNTTYMELSSLRSDDTAVYYCAREYIAARLDYFDSWGQGTLVTVSS

Фиг. 3 б)

MF	Мишень :	SEQ ID No	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4
3370	рЭФР	16-22	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKASGYTFT	SYGIS	WVRQAPGQLEW MG	WISAYNGNTNYA QKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCAK	DRHWHHWLDAF DY	WGQGLVT VSS
3755	рЭФР	23-29	QVQLVQSGSELKKPG ASVKISCKASGYDFT	NYAMN	WVRQAPGHG LEWMG	WINANTGDPT YAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQ ISSLKAEDSAVYYCTR	ERFLEWLHF DY	WGQGL VTVSS
4280	рЭФР	30-36	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKVSGYTTLT	ELSMH	WVRQAPGKG LEWMG	GFDPEYGKTF FAQNFQG	RVTMTEDTSADTAYM ELSSLRSEDVAVYYCA T	EGYYETTTY YNLFDS	WGQGL VTVSS
4289	рЭФР	37-43	QVQLVQSGSELKKPG ASVKVSKTSGYTFT	DYAMT	WVRQAPGQG LEWMG	WITNTGDPT YAPGFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQ ISSLKAEDTAVYYCAR	VYHWIRGFE F	WGQGL VTVSS
5790	LGR5	44-50	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSFS	SSSSYWG	WIRQPPGKGL EWIG	SFYYSGNITYY NPSLKS	RVTISEDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	QTYSSSWDG VLYYFDY	WGQGL VTVSS
5803	LGR5	51-57	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSNNGSIS	TYYWS	WIRQPPGKGL EWIG	YVYTGRTKY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLN LSSVTAADTAVYYCAR	GGIVVPAAR DYYYMDV	WGKGT VTVSS
5805	LGR5	58-64	EVQLVQSGAEVKKPG ESLKIACKGSGFSFT	SHWIG	WVRQKPGRG LEWMG	VIYPGSDTR YSPSFQG	QVTVSADKSINTAYLQ WNSLKASDTAIYYCAR	PNSGSPRYFE F	WGRGT VTVSS
5808	LGR5	65-71-	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SSSYWG	WIRQPPGKGL EWIG	SFYYSGNITYY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	QEYYGSGS PSYYFDY	WGQGL VTVSS

Фиг. 3 б), продолжение

5809	LGR5	72-78	EVQLVQSGAEVKKPG	SHWIA	WVRQMPGKG	IVYPGSDTR	QVTISADKSITTAYLQ	HEWELLGPF	WGQGL
------	------	-------	-----------------	-------	-----------	-----------	------------------	-----------	-------

			ESLKISCKGSGDSFI		LEWMG	YSPSFQG	WSSLKASDTAMYYCA R	DY	VTVSS
5814	LGR5	79-85	EVQLVQSGAEVKKKPG SSVKVSCASGGTST	NDAIS	WVRQTPGQG LEWMG	SIIPILDTTDH AQKFQG	RVTITADKSTNTAYME LNSLRSDDTAVYYCAR	EHIAARQDY FDY	WGQGTL VTVSS
5816	LGR5	86-92	EVQLVQSGSKLKKPG ASVKVSCASGYTFT	SYTMN	WVRQAPGQG LEWMG	WINTDTGDPT YAQGFTG	RFVFSLDTSVSTAFLQ INSLKAEDTAVYYCAR	GDCDSTSCY RYSYGYEDY	WGQGTL VTVSS
5817	LGR5	93-99	QVQLVQSGAEVKKKPG SSVKVSCKVSGGTFR	SYAIS	WVRQAPGQG LEWMG	GIIPIFDTRNY AQILQG	RVTITADLSTSTAYME LNSLRSEDTAIYYCAR	GSDEGDWFD P	WGQGTL VTVSS
5818	LGR5	100- 106	EVQLVQSGTEVRKPG SSVKVSCASGGTFS	NYAIS	WVRQAPGQG LEWMG	SIIPILGTTDH AQKFQD	RVTITADKSSNTTYME LSSLRSDDTAVYYCAR	EYIAARLDYF DS	WGQGTL VTVSS

Фиг. 3 с)

MF1337: Последовательность Seq ID NO: 107

gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
ctctgactacatcttcaccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaagggcttgaatg
gatgggatggatgagcgctaacactggaaacacgggctatgcacagaagtccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggccgtt
attctgtgcaggagtagtctttcaagacagagacgggcctactatcacttcgctctggacgtctg
ggccaaggaccacggtcaccgtctccagt

MF3370: Последовательность Seq ID NO: 108

caggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
ctctggttacaccttaccagctatggtatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcagcgttacaatggtaacacaaactatgcacagaagctccagggcagagtcaccatg
accacagacacatccacgagcagcctacatggagctgaggagctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaaaagatcgtcattggcattggtggctggacgcctttgattattggggccaaggtacct
ggtcaccgtctccagt

MF3755: Последовательность Seq ID NO: 109

caggtgcagctggtgcagctctgggtctgagttgaagaagcctggggcctcagtgaagatttctgcaagg
ctctggatacacttactaactatgctatgaattgggtgcgacaggccctggacacgggcttgagtg
gatgggatggatcaacgccaacactggggacceaacgtatgccagggttcacaggacggtttgtcttc
tccttggacacctctgtcagcagggcatatctgcagatcagcagtttaaggctgaggactctgccgtgt
attactgtacagagagcgtattttggagtggttacactttgactactggggccagggaaccctggtcac
cgtctccagt

MF4280: Последовательность Seq ID NO: 110

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctctgcaagg
ttccggatacaccttactgaattatccatgcactgggtgcgacaggctctggtaaagggcttgaatg
gatgggaggcttctgactgagatggtaaaacattcttcgacagaactccagggcagagtcaccatg
accaggacacatctgcagacacagcctacatggagctaagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaacaggggtattatgagactactattactacaaccttttactcctggggcca
gggaaccctggtcaccgtctccagt

MF4289: Последовательность Seq ID NO: 111

caggtgcagctggtgcaatctgggtctgaattgaagaagcctggggcctcagtgaaggttctctgcaaga
ctctggatacaccttactgactatgctatgacttgggtgcgacaggccctggacaagggcttgaatg
gatgggatggatcaccaccaacactggggacceaacgtatgccccgggcttcacaggacggtttgtcttc
tccttggacacctctgtcagcagggcatatctgcagatcagcagcctaaaggccgaggacactgccgtat
attactgtgcgagagtgtatcattggataggggattttagtttggggccagggaaccctggtcaccgt
ctccagt

MF5790: Последовательность Seq ID NO: 112

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagacctgtcctcacctgcactg

Фиг. 3 с), продолжение

tctctgggtggtccttcagcagtagtagtctactggggctggatccgccagccccaggggaaggggct
ggagtggattgggagtttctattatagtggggaacacctactacaaccgtccctcaagagtcgagtcacc
atatccgaagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccagacacggctg
tgtattactgtgcgagacagacgtatagcagcagctgggacggggctctgtactactttgactactgggg
ccaggaaccctggtcaccgtctccagt

MF5803: Последовательность Seq ID NO: 113

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggatgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactg
tctctaattggctccatcagctactactggagctggatccggcagccccaggggaaggggctggagtg
gattggatatgtctattactgggcgaccaagtacaaccctccctcaagagtcgagtcaccatatca
gtagacacgtccaagaaccagttctccctgaacctgagttctgtgaccgctgcggacacggccgtgtatt
actgtgcgagagggggattgtagtagtcccagctgcgcgggactattactactacatggacgtctgggg
caaagggaccacggtcaccgtctccagt

MF5805: Последовательность Seq ID NO: 114

gaggtgcaactgggtgcagctcggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctgaagatcgcctgtaagg
gttctggattcagttttaccagccactggatcgctgggtgcgccagaagcccgggagaggcctggagtg
gatgggggtcatctatcctgggtgactctgataccagatacagcccctcctccaaggccaggtcaccgtc
tcagccgacaagtccatcaataccgcctacctgcagtggaacagcctgaaggcctcggacaccgccatat
attactgtgcgagaccgaacagtgaggagtcccccgtacttcgagttctggggccgtggcacccctggcac
cgtctccagt

MF5808: Последовательность Seq ID NO: 115

caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggatgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactg
tctctgggtggtccttcagcagtagtagtactactggggctggatccgccagccccaggggaaggggct
ggagtggattgggagtttctattatagtggggaacacctactacaaccgtccctcaagagtcgagtcacc
atatccgtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccagacacggctg
tgtattactgtgcgagacagaggtattactatgggtcggggagtccttcgtactactttgactactgggg
ccaggaaccctggtcaccgtctccagt

MF5809: Последовательность Seq ID NO: 116

gaggtgcagctgggtgcagctcggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctgaagatctcctgtaagg
gttctggagacagttttatcagccactggatcgctgggtgcgccagatgccgggaaaggcctggagtg
gatggggatcgctatcctgggtgactctgataccagatacagcccctcctccaaggccaggtcaccatc
tcagccgacaagtccatcaccaccgcctacttgcagtgagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgt
attactgtgcgagacacagtgaggaaactctggcccctttgactactggggccaggggaaccctggtcac
cgtctccagt

MF5814: Последовательность Seq ID NO: 117

gaggtgcagctgggtgcagctcggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggctcctgcaagg
cttctggaggcaccctcaataacgatgctatcagttgggtgcgacagaccctggacaaggccttgagtg
gatgggaagtatcctctatccttgatacaacagaccacgcacagaagttccagggcagagtcacgatt
accgaggacaatccacgaacacagcctacatggagctgaacagcctgagatctgatgacacggccgtgt
attactgtgcgagagacatagcagctcgtcaggactactttgactattggggccaggggaaccctgggt

Фиг. 3с), продолжение

caccgtctccagt

MF5816: Последовательность Seq ID NO: 118

gaggtgcagctggtgcagctctgggtctaaattgaagaagcctggggcctcagtgaggtttctgcaagg
cttctggatacaccttcactagctatactatgaattgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaacaccgacactggggaccaacgtatgccagggttcacaggacggttgtcttc
tccttgacacctctgtcagcagggcatttctacagatcaacagcctaaaggctgaggacactgccgat
attactgtgcgagaggagattgtgatagtagctgctatagatacagttatggttacgaggactactg
gggccagggaaccctggtcaccgtctccagt

MF5817: Последовательность Seq ID NO: 119

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaggctcctgcaagg
tttctggaggcaccttcaggagctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggagggatcatcctatctttgatacaagaaactacgcacagattcttcagggcagagtcacgatt
accgaggacttatccagagcacagcctacatggagctgaacagctctgagatctgaggacacggccattt
attactgtgcgagaggagcgcagagggggactggttcgaccctggggccaaggaaccctggtcaccgt
ctccagt

MF5818: Последовательность Seq ID NO: 120

gaggtgcagctggtgcagctctgggactgaggtgaggaagcctgggtcctcggtgaggctcctgcaagg
cttctggaggcaccttcagcaactatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacagggcttgagtg
gatgggaagtatcatcctatccttggaaacaacagaccacgcacagaagtccaggacagagtcacgatt
accgaggacaaatcctcgaacacaacctacatggagctgagcagcctgagatctgatgacacggccgat
attactgtgcgagagagtatatagcagctcgtctggactactttgactcttggggccagggaaccctggt
caccgtctccagt

Фиг. 4

a) Последовательность Seq ID NO: 121

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

b)

Последовательность Seq ID NO: 122

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Последовательность Seq ID NO: 123

gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagca
ttagcagctacttaaattggatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtg
ggctccatcaaggtcagtgagcagtgatctgggacagattcactctcaccatcagcagcttgcacactgaagatttgcactt
actactgtcaacagagttacagtaccctccaacgttcggccaagggaagtgagatcaaa

c)

Последовательность Seq ID NO: 124

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательность Seq ID NO: 125

gaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctggtgtgctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgteaca
gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc
tacgctgcgaagtcaccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg

d)

Последовательность Seq ID NO: 126

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

e)

CDR1 - QSISSY, Последовательность Seq ID NO: 127

CDR2 – AAS Последовательность Seq ID NO: 128

CDR3 – QQSYSTPPT Последовательность Seq ID NO: 129

Фиг. 5

a)

CH1:

Последовательность Seq ID NO: 130

gctagcaccgaaggcccatcggtcttcccctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctggt
 caaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggaactcagcggccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta
 cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtcgtgacctgacctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaa
 tcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt

Последовательность Seq ID NO: 131

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

b)

Hinge:

Последовательность Seq ID NO: 132

gagcccaaatcttggacaaaaactcacacatgccaccgtgccca

Последовательность Seq ID NO: 133

EPKSCDKTHTCPPCP

c)

CH2:

Последовательность Seq ID NO: 134

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Последовательность Seq ID NO: 135

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggt
 cacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg
 ccaagacaaagcgcgggaggagcagtacaacagcacgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa

Фиг. 5 d)

CH3: L351K и T366K

Последовательность Seq ID NO: 136

GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG-

Последовательность Seq ID NO: 137

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgaagtgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctc
ccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctc
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttga

e)

CH3: L351D и L368E

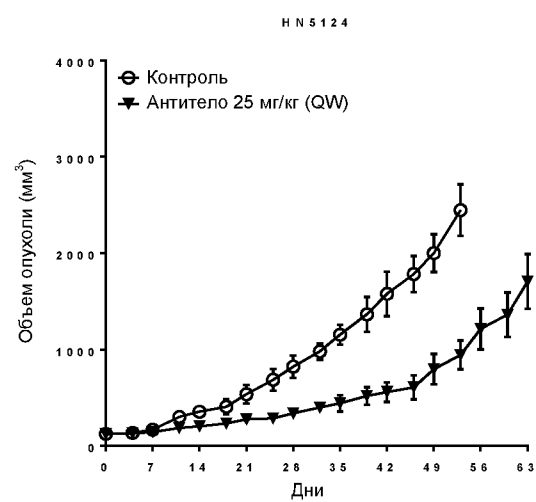
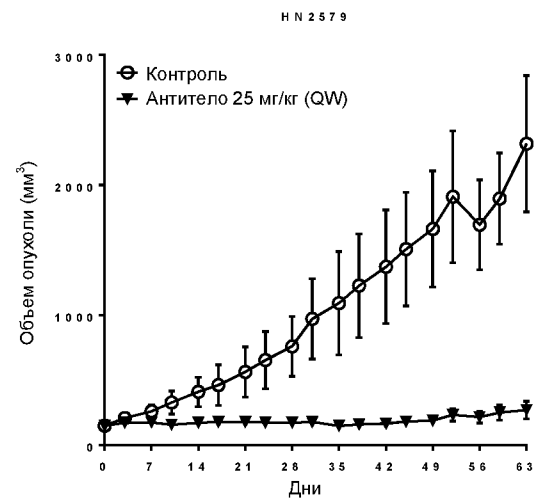
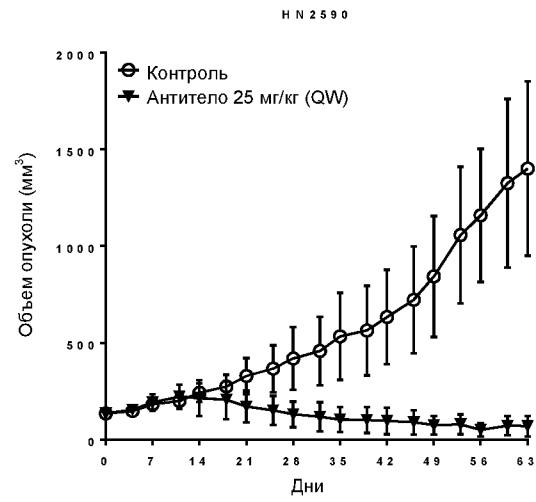
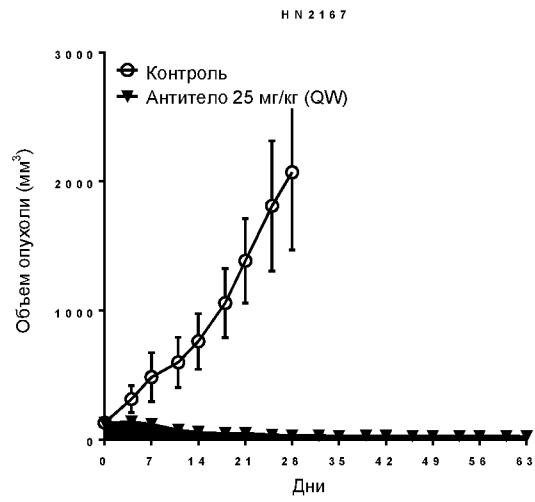
Последовательность Seq ID NO: 138

GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG-

Последовательность Seq ID NO: 139

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgacccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgca
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctc
ccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctc
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttga

Фиг. 6



Фиг. 6, продолжение

