

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392865 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.01.23

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.19

(51) Int. Cl. C07K 16/26 (2006.01)  
A61P 25/02 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

---

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ЭПИРЕГУЛИН

---

(31) 63/191,496

(32) 2021.05.21

(33) US

(86) PCT/US2022/030058

(87) WO 2022/246078 2022.11.24

(71) Заявитель:  
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Бейдлер Кейтрин Бротигем, Бойлс  
Джефри Стритман, Джирард Дэниел  
Скотт, Харлан Шэннон Мари,  
Джонсон Майкл Парвин (US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Гизатуллин  
Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,  
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.  
(RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к антителам к эпирегулину, содержащим их композициям и способам получения и/или применения антител и/или их композиций для хронических болевых расстройств, таких как хроническая боль при остеоартрите, или хроническая диабетическая периферическая нейропатическая боль, или хроническая боль в пояснице.

---

202392865

A1

A1

202392865

## СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ЭПИРЕГУЛИН

Настоящее изобретение относится к соединениям, фармацевтическим композициям и способам, которые включают антитела, направленные против человеческого эпирегулина, и их применению при лечении хронической боли, включая ноцицептивную, нейропатическую и смешанную боль, и, в частности, при лечении боли при остеоартрите (ОА), или диабетической периферической нейропатической боли (DPNP), или хронической боли в пояснице (CLBP).

Хроническую боль на основании ее механизма подразделяют на разные категории: ноцицептивную, нейропатическую и смешанную. Ноцицептивная боль вызывается

раздражителями, которые потенциально или фактически вызывают поражение ненейрональных тканей. Это активирует ноцицептивные рецепторы в периферической сенсорной системе. Боль при остеоартрите является классическим примером соматической ноцицептивной боли.

Нейропатическая боль вызывается поражениями или заболеванием центральной или периферической нервной системы, что приводит к неадекватной гиперчувствительности

сенсорной нервной системы. Боль при диабетической периферической нейропатии является классическим примером периферической нейропатической боли. Состояния, при которых наблюдаются признаки как ноцицептивной, так и нейропатической боли, такие как хроническая боль в пояснице, классифицируются как смешанная боль.

Хроническая боль является широко распространенным состоянием с огромным социальным влиянием. По оценкам, в 2016 году 20,4% взрослого населения в Соединенных Штатах Америки испытывали хроническую боль, определяемую как боль большую часть дней или каждый день за последние 6 месяцев по данным Национального опроса о состоянии здоровья. По оценкам, 8% населения имели хроническую боль, которая ограничивала их жизнь или трудовую деятельность большую часть дней или каждый день за последние 6 месяцев. Таким образом, хроническая боль является ведущей причиной расходов на здравоохранение, а ежегодные затраты на лечение хронической боли в Соединенных Штатах Америки в 2010 году оценивались приблизительно в 635 миллиардов долларов. Несмотря на высокое бремя данных заболеваний и их социальное воздействие, лечение хронической боли в настоящее время является неудовлетворительным. Немедикаментозная терапия в отдельности редко бывает достаточной для облегчения боли или функционального улучшения, а доступные виды медикаментозной терапии разнообразны и обладают скромной эффективностью, при этом некоторые из них связаны со значительными рисками для здоровья. В настоящее время самыми часто используемыми лекарственными средствами для облегчения наиболее распространенных типов хронической боли являются ацетаминофен, нестероидные противовоспалительные препараты и опиоиды.

Габапентиноиды, другие антиконвульсанты (такие как дивальпроат натрия, карбамазепин или ламотриджин) и некоторые антидепрессанты (такие как трициклические или дулоксетин) можно применять при некоторых определенных болевых расстройствах. Современный фармакологический арсенал обычно обеспечивает низкие уровни эффективности и

характеризуется проблемами с переносимостью и/или вредными побочными эффектами. Опиоиды эффективны против острой боли, но они являются ограниченным вариантом лечения хронической боли из-за высокого риска злоупотребления и потенциально серьезных нежелательных реакций. Влияние хронической боли на физическое, эмоциональное и финансовое состояние пациента и общество в сочетании с отсутствием эффективных и переносимых вариантов лечения представляет серьезную нерешенную медицинскую проблему.

Эпирегулин является членом семейства лигандов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), которое включает в себя 7 лигандов: TGF- $\alpha$  (TGFA), эпирегулин (EREG), EGF, гепарин-связывающий EGF (HB-EGF), эпиген (EPGN), амфирегулин (AREG) и бетацеллюлин (BTC) (Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol.* 2009;218(3):460–466). В дополнение к EGFR (ErbB1) в этом семействе рецепторов есть еще 3 дополнительных рецептора (ErbB2, ErbB3 и ErbB4), из которых ErbB3 и ErbB4 могут связывать лиганды семейства нейринулов, а также избирательно связывать члены семейства лигандов EGFR (эпирегулин, бетацеллюлин и HB-EGF). Эти лиганды синтезируются в виде трансмембранных белков, которые расщепляются протеолитическими ферментами с образованием растворимых лигандов, которые могут действовать паракринным или аутокринным образом, регулируя различные биологические процессы. Эпирегулин может связываться как с EGFR, так и с ErbB4, индуцируя передачу сигналов посредством гомодимеризации или лиганд-индуцированной гетеродимеризации с ErbB2 или ErbB3.

Передача сигналов с помощью эпирегулина способствует широкому спектру физиологических состояний, таких как воспаление, заживление ран и ангиогенез (Riese et al. *Epiregulin: Roles in Normal Physiology and Cancer, Semin Cell Dev Biol.* 2014, 0:49–56). Передача сигналов с помощью эпирегулина посредством пар гомо- или гетеродимеров рецептора EGFR обеспечивает возможность потенциальной активации многочисленных последующих сигнальных путей, таких как сигнальные пути ERK, MAPK, AP1, PI3K, JAK/STAT и NF $\kappa$ B. Было хорошо описано, что активация таких путей, как JAK/STAT и NF $\kappa$ B, стимулирует воспаление, а активация передачи сигналов AP1 стимулирует активацию c-FOS и c-JUN, которые являются маркерами активации нейронов. Недавно опубликованные данные по доклиническим моделям указывают на роль эпирегулина в модуляции хронической боли, которая характеризуется нейрональным воспалением и нейрональной активацией, что позволяет предположить, что сигнальные пути эпирегулина, модулирующие воспалительную и нейрональную активацию, являются потенциальными механизмами развития хронических болевых расстройств. Данные свидетельствуют о том, что сигнальный путь EGFR участвует в патогенезе нейропатической боли (Kersten, C, Cameron MG, Laird B, Mjåland S. *Epidermal growth factor receptor-inhibition (EGFR-I) in the treatment of neuropathic pain. Br J Anaesth.* 2015; 115(5):761–767). Однако было обнаружено, что нацеливание на рецептор антителами к EGFR или ингибиторами тирозинкиназы EGFR связано с

высокой частотой нежелательных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и кожи, что ограничивает их потенциальное применение при хронических болевых расстройствах.

Антитела, которые связываются как с TGF $\alpha$ , так и с эпирегулинами, описаны в WO 2012/138510 вместе со способами лечения диабетической нефропатии. LY3016859

5 представляет собой моноклональное антитело, связывающее эпирегулин и трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), которое было протестировано в клинических исследованиях фазы I и прошло оценку на предмет безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики и эффективности у здоровых субъектов и пациентов с диабетической нефропатией (см. Sloan-Lancaster, et al., Evaluation of the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Efficacy After Single and Multiple

10 Dosings of LY3016859 in Healthy Subjects and Patients With Diabetic Nephropathy, Clinical Pharmacology in Drug Development 2018, 7(7) 759–772). В работе Sloan-Lancaster et al. указано, что LY3016859 имеет большую аффинность к TGF $\alpha$ , чем к эпирегулину, и что введение LY3016859 не приводило к каким-либо очевидным эффектам по изменению уровней биомаркеров, связанных с нефропатией (см. также Beidler, et al., J. Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014,

15 349(2):330–343). Данные нелинейной кинетики свидетельствовали о мишень-опосредованном распределении лекарственного средства, а для высоких уровней взаимодействия с растворимой мишенью требовались высокие дозы. Примечательно, что в обоих опубликованных исследованиях наблюдались высокие уровни анти-LY3016859 антител, но не было явного влияния на фармакокинетику или взаимодействия с мишенями, о чем свидетельствовало зависимое от дозы и

20 времени увеличение циркулирующего эпирегулина, измеренное в анализе переносимости лекарственного средства. Важной нерешенной задачей является нахождение антител для лечения симптомов хронической боли, которые в большей степени селективны к эпирегулину, имеют более высокую аффинность к нему и с меньшей вероятностью индуцируют реакцию антител против лекарственного средства. Также нерешенной задачей остается нахождение альтернативных

25 и/или улучшенных вариантов лечения хронических болевых расстройств, включая ноцицептивную, нейропатическую и смешанную боль, и, в частности, лечения боли при остеоартрите (ОА), или боли при диабетической периферической нейропатии, или хронической боли в пояснице, и/или вариантов лечения для терапии устойчивой к лечению боли.

### 30 **Изложение сущности изобретения**

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к новым антителам против человеческого эпирегулина, их фармацевтическим композициям и способам применения этих антител и композиций при лечении боли и хронических болевых расстройств. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые

35 содержат переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), причем LCVR содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и выбраны из групп

комбинаций CDR, представленных в таблице 1. Идентификаторы последовательностей, используемые в настоящем документе, перечислены в таблице 1, а последовательности представлены в приведенном в настоящем документе перечне аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. Антитело 1 представляет собой полностью человеческое моноклональное высокоаффинное антитело, являющееся иммуноглобулином G4 (IgG4), которое связывается с остатками в С-концевых областях человеческого эпирегулина и предотвращает связывание человеческого эпирегулина с EGFR и активацию EGFR. Антитело 1 представляет собой улучшенное антитело против эпирегулина для осуществления терапии у человека, которое обладает комбинацией преимущественных свойств, включая повышенную аффинность, селективность, сниженный риск развития незапланированных и нежелательных эффектов, сниженный риск иммуногенности, высокую эффективность и длительность действия, а также другие желательные свойства, и обеспечивает возможность создания более эффективных средств для блокирования эпирегулина и лечения боли и хронических болевых расстройств.

15 **Таблица 1. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности для антитела 1**

	<b>Антитело 1</b>
<b>SEQ ID HC</b>	1
<b>SEQ ID LC</b>	2
<b>SEQ ID HCVR</b>	3
<b>SEQ ID LCVR</b>	4
<b>SEQ ID HCDR1</b>	5
<b>SEQ ID HCDR2</b>	6
<b>SEQ ID HCDR3</b>	7
<b>SEQ ID LCDR1</b>	8
<b>SEQ ID LCDR2</b>	9
<b>SEQ ID LCDR3</b>	10
<b>SEQ ID: ДНК HC</b>	11
<b>SEQ ID ДНК LC</b>	12

Соответственно, варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к антителам, содержащие LCVR и HCVR, причем LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а HCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение также относится к антителам, содержащим LCVR и HCVR, причем LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а HCVR имеет аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 3, с шарнирной областью и областью Fc, выбранной из SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к антителам, содержащим LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HC, имеющую  
5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение также относится к антителам, содержащим LC и HC, имеющим аминокислотные последовательности с по меньшей мере 95% гомологией аминокислотным последовательностям LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

10 В настоящем документе термин «антитело 1» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 10,  
15 аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 2, или кодируемую ДНК HC последовательность SEQ ID NO: 11, или кодируемую ДНК LC последовательность SEQ ID NO: 12. Если не указано иное, каркасная и CDR-последовательности в каждом из антител, для которых в настоящем  
20 документе представлены последовательности, являются аннотированными в соответствии с правилами аннотирования согласно способу North, *et al. J. Mol. Biol.* 2011: 406: 228–256.

Карбоксиконцевая часть каждой HC определяет константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторные функции, и в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела имеют одну или более модификаций в константной области каждой HC,  
25 которые снижают эффекторные функции. Предпочтительно варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой антитела IgG4 и, таким образом, содержат Fc-область IgG4 или Fc-область, полученную из IgG4 человека, например, модифицированную Fc-область IgG4.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в шарнирную область IgG4 и Fc-область вносят модификации константной области обеих HC, которые снижают эффекторные  
30 функции, и аминокислотные замены. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предусмотрены модификации в константной области обеих HC, которые включают в себя аминокислоту аланин в обоих остатках 229 и 230 (положения 234–235 по индексу ЕС) (примеры представлены в HC антитела 1 и проиллюстрированы в SEQ ID NO: 52) и дополнительные модификации константной области обеих HC, способствующие стабильности, которые включают  
35 в себя аминокислоту пролин в положении остатка 223 (положение 228 по индексу ЕС) (пример представлен в HC антитела 1 и проиллюстрирован в SEQ ID NO: 51), а также делецию

аминокислоты лизин в положении остатка 442 (положение 447 по индексу ЕС) (пример представлен в НС и проиллюстрирован в SEQ ID NO: 1).

Считается, что антитела по настоящему изобретению обладают сочетанием особенно преимущественных свойств по сравнению с антителами против эпирегулина предшествующего уровня техники, включая, без ограничений, одно или более из следующих свойств: 1) высокая аффинность связывания и желательные скорости ассоциации и диссоциации, 2) эффективность при нейтрализации человеческого эпирегулина для достижения ответа в виде смягчения боли и эффективности *in vivo*, 3) достаточная эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или профилактики болевых расстройств; 4) продолжительный срок действия; 5) достаточно ограниченные реакции в местах инъекции, 6) приемлемо низкая иммуногенность (т. е. они достаточно неиммуногенны для человека); 7) уменьшение нежелательных реакций в виде кожной сыпи и/или 8) желательная стабильность *in vivo*, физическая и химическая стабильность, включая, без ограничений, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или применения при лечении болевых расстройств, например хронической боли, включая ноцицептивную, нейропатическую и смешанную боль, и, в частности, при лечении хронической боли при остеоартрите, или хронической диабетической периферической нейропатической боли, или хронической боли в пояснице.

Варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают значительный прогресс по сравнению с предшествующим уровнем техники за счет получения антител против человеческого эпирегулина, их композиций и способов, используемых для лечения, подавления или облегчения болевых расстройств, посредством нейтрализации эпирегулина с использованием фармакологически преимущественного антитела против человеческого эпирегулина, как предусмотрено в описанных в настоящем документе вариантах осуществления. Антитела против человеческого эпирегулина по настоящему изобретению способны смягчать болевые симптомы, облегчать патофизиологию боли, предпочтительно посредством ингибирования болевого ответа, в частности, при хронических болевых расстройствах и болевых состояниях. Клиническое применение указанных антител может приводить к более продолжительному облегчению связанного (-ых) с болью и подлежащего (-их) лечению заболевания (-ий).

Дополнительно существует потребность в диагностических антителах против человеческого эпирегулина, которые специфичны для человеческого эпирегулина, обладают улучшенной аффинностью связывания и демонстрируют повышенную чувствительность при определении наличия человеческого эпирегулина, а также в улучшенных условиях фермент-связанного иммуносорбентного исследования (ELISA), которые обеспечивали бы минимальные помехи и широкую линейность при разведении. В соответствии с некоторыми аспектами настоящего описания предложены антитела против человеческого эпирегулина, включая антитела, нейтрализующие человеческий эпирегулин, которые связывают человеческий эпирегулин,

представленный SEQ ID NO: 21. Термин «эпирегулин» или «человеческий эпирегулин» относится к белку человеческого эпирегулина. В настоящем документе «эпирегулин» относится к зрелому пептиду эпирегулину. Эпирегулин (также известный как EREG, EPR) представляет собой белок из 46 аминокислот, принадлежащий к пептидным гормонам семейства эпидермального фактора роста (EGF). Эпирегулин продуцируется в виде трансмембранного предшественника эпирегулина, состоящего из 162 аминокислот, который расщепляется с высвобождением зрелого пептида из 46 аминокислот следующей последовательности:

«VSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDM SQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL» (SEQ ID NO: 21) (см., например, Toyoda, et al., Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. FEBS Lett. 1995; 377:403–7).

Человеческий эпирегулин (SEQ ID NO: 22), как описано и получено в примере 2, можно, например, использовать в описанных в настоящем документе экспериментах *in vitro*. Ссылки на способность описанных в настоящем документе антител связывать и/или нейтрализовать человеческий эпирегулин относятся также к их способности связывать и нейтрализовать человеческий эпирегулин в экспериментах *in vitro*.

В настоящем документе термины «антитело против человеческого эпирегулина» или «антитело к человеческому эпирегулину» относятся к антителу, которое связывается с человеческим эпирегулином и при его введении *in vitro* или *in vivo* приводит к нейтрализации и/или блокировке ответа, например, по меньшей мере одной значительно сниженной активности. Например, желательное снижение передачи сигналов эпирегулина, о чем свидетельствует изменение реагирующего (-их) на эпирегулин молекулярного (-ых) или клеточного (-ых) конечного (-ых) показателя (-ей). В настоящем документе относящиеся к эпирегулину термины «передача сигнала», и «трансдукция сигнала», и «эпирегулин-опосредованный» относятся к клеточным и/или межклеточным ответам, которые возникают в результате активности эпирегулина.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты осуществления антитела включают в себя моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизованное антитело, химерное антитело или конъюгированное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Пример антитела представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые поперечно сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. LC классифицируют как каппа или лямбда, каждая из которых характеризуется определенной константной областью. Варианты осуществления настоящего изобретения могут включать в себя антитело IgG1 или IgG4, а также легкие цепи каппа или легкие цепи лямбда. Предпочтительно



антитела по настоящему изобретению содержат константные области легкой цепи, которые представляют собой константные области каппа.

НС классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE соответственно. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей включает в себя вариабельную область из приблизительно 100–125 или более аминокислот, в первую очередь отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторные функции. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, который является частью антитела, связывающего антиген (-ы). CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится на карбоксиконце тяжелой цепи. Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab.

Антитела по настоящему изобретению содержат НС в IgG, которые можно дополнительно разделить на подклассы, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, и варианты осуществления настоящего изобретения могут включать в себя одну или более модификаций в константной области каждой НС, например, которые усиливают или ослабляют эффекторную функцию. Термин «область Fc», используемый в настоящем документе, относится к области антитела, которая содержит домены CH2 и CH3 тяжелой цепи антитела. Необязательно область Fc может включать в себя часть шарнирной области или всю шарнирную область тяжелой цепи антитела. Известно, что IgG1 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), а описанные в настоящем документе мутации Fc могут уменьшать агрегацию, уменьшать или усиливать активности ADCC или CDC (или другие функции) и/или модифицировать фармакокинетику антител. В описанных в настоящем документе вариантах осуществления антитела против человеческого EREG обладают пониженным связыванием с рецепторами FcγR и C1q, что снижает или устраняет цитотоксичность, которая может быть индуцирована антителами IgG с областями Fc дикого типа. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления мутации вводят в область Fc в положениях, описанных в настоящем документе. Безопасность для пациента может улучшаться за счет значимого снижения или устранения эффекторных функций указанных антител против человеческого EREG, содержащих модифицированную область Fc, и это в комбинации с другими свойствами, описанными в настоящем документе, позволяет получать терапевтические агенты с улучшенным профилем полезных активностей, избегая при этом нежелательных активностей.

При экспрессии в определенных биологических системах антитела гликозилируются в области Fc. Как правило, гликозилирование происходит в области Fc антитела в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к

аспарагину. Антитела также могут быть гликозилированы в других положениях. Антитела по настоящему изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела представляют собой антитела, полученные из единственной копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, и не определяются

5 способом, которым они получены. Моноклональные антитела могут быть получены, например, посредством гибридомных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например, CDR-трансплантации, или комбинаций указанных или других технологий, известных в данной области техники. Настоящее изобретение предполагает, что антитела по настоящему изобретению представляют собой человеческие или

10 гуманизированные антитела. В контексте моноклональных антител термины «человек» и «гуманизированный» хорошо известны специалистам в данной области техники (Weiner LJ, J. Immunother. 2006; 29: 1–9; Mallbris L, et al., J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13–15). Примеры осуществления антител по настоящему изобретению также включают в себя фрагменты антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат по меньшей мере часть антитела,

15 сохраняющую способность специфично взаимодействовать с антигеном, таких как фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv-фрагменты антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), Fd-фрагмент и линейные антитела.

Аминоконцевая часть каждой LC и HC включает в себя вариабельную область, состоящую из приблизительно 100–120 аминокислот, в первую очередь отвечающую за распознавание

20 антигена посредством содержащихся в ней CDR. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются важными участками антитела для специфичности связывания антигена. Каждая VH и VL состоит

25 из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В настоящем документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые формируют специфичные взаимодействия с антигеном. На функциональную способность антитела связывать определенный

30 антиген в значительной степени влияют шесть CDR. Определение принадлежности аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными в Kabat (Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 196, 901–

35 917 (1987); Al-Lazikani et al., “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927–948 (1997)), North (North et al., “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, Journal of Molecular Biology, 406, 228–256 (2011)),

или в IMGT (международная база данных ImMunoGeneTics, доступная по адресу [www.imgt.org](http://www.imgt.org); см. Lefranc et al., *Nucleic Acids Res.* 1999; 27:209–212).

Для целей настоящего изобретения, за исключением случаев, когда указано иное, определения CDR по Норту применяют для описанных в настоящем документе антител к эфирегулину и для определения принадлежности аминокислот к CDR-доменам в пределах областей LCVR и HCVR. Ниже в таблице 2 представлены CDR-последовательности для антитела 1 и/или антител по настоящему изобретению, основанные на системах Норта, Кабата, Чотиа и/или IMGT соответственно, сгенерированные с использованием библиотеки SAbPred/ANARCI (Dunbar and Deane, “ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification”, *Bioinformatics*, 32, 298–300 (2016)).

Таблица 2.

Примеры CDR антитела 1 (или антител по настоящему изобретению)						
Ат	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
По Норту	TVSGGSI SSYYWS (SEQ ID NO: 5)	RIYPSGNTN (SEQ ID NO: 6)	ARGGLVMDV (SEQ ID NO: 7)	RASQSVEFS YLA (SEQ ID NO: 8)	YGASSR AT (SEQ I D NO: 9)	HQYGTNP FT (SEQ ID NO: 10)
По Кабату	SYIWS (SEQ ID NO: 31)	RIYPSGNTNY NPSLKS (SEQ ID NO: 32)	GGLVMDV (SEQ ID NO: 33)	RASQSVEFS YLA (SEQ ID NO: 34)	GASSRA T (SEQ I D NO: 35)	HQYGTNP FT (SEQ ID NO: 36)
По Чотиа	GGSISSY (SEQ ID NO: 37)	YPSGN (SEQ ID NO: 38)	GGLVMDV (SEQ ID NO: 39)	RASQSVEFS YLA (SEQ ID NO: 40)	GASSRA T (SEQ I D NO: 41)	HQYGTNP FT (SEQ ID NO: 42)
По IMGT	GGSISSY Y (SEQ ID NO: 43)	IYPSGNT (SEQ ID NO: 44)	ARGGLVMDV (SEQ ID NO: 45)	QSVEFSY (SEQ ID NO: 46)	GAS (SEQ I D NO: 47)	HQYGTNP FT (SEQ ID NO: 48)

Варианты осуществления антител по настоящему изобретению обеспечивают сочетание

5 нескольких фармакологически полезных и важных активностей, и, в одном отношении, они способны связываться с высокой аффинностью с человеческим эпирегулином и с высокой специфичностью к человеческому эпирегулину, а также обладают другими полезными свойствами. Термины «связывают» и «связывает», используемые в настоящем документе, предназначены для обозначения, если не указано иное, способности белка или молекулы

10 образовывать взаимодействия на основании притяжения с другим белком или молекулой, приводящие к близости двух белков или молекул, что определяется стандартными способами, известными в данной области техники. Фраза «специфически связывается», используемая в настоящем документе, относится к аффинности антитела против эпирегулина к человеческому эпирегулину и означает, если не указано иное, что  $K_D$  менее чем приблизительно  $2 \times 10^{-9}$  М, а

15 предпочтительно менее чем приблизительно  $2 \times 10^{-11}$  М и еще более предпочтительно от приблизительно  $2 \times 10^{-11}$  М до приблизительно  $2 \times 10^{-12}$  М, как определено при рН приблизительно 7,4 обычными методами, известными в данной области, включая применение MSD-SET (равновесное титрование раствора), как описано в настоящем документе. Фраза «специфически связывается» также указывает на относительную аффинность антитела против эпирегулина по

20 отношению к человеческому эпирегулину по сравнению с другими антигенами и, в частности, с

EGFR-лигандом  $TGF\alpha$ , причем аффинность к человеческому эпирегулину приводит к специфическому распознаванию человеческого эпирегулина и к отсутствию связывания с другими протестированными лигандами EGFR.

Варианты осуществления антител по настоящему изобретению могут быть  
5 экспрессированы и получены с помощью различных методик, известных в данной области техники, из конструкторов, содержащих последовательности по настоящим вариантам осуществления. Термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов, включая  
10 одноцепочечные и/или двухцепочечные молекулы, содержащие нуклеотиды, такие как молекулы ДНК, кДНК и РНК, включающие в себя нативные, модифицированные нуклеотиды и/или их аналоги. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также могут включать в себя субстраты, включенные в них, например, посредством ДНК- или РНК-полимеразы или синтетической реакции. Молекула ДНК по настоящему изобретению представляет собой молекулу ДНК, которая  
15 содержит не встречающуюся в природных условиях полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из полипептидов, встречающихся в антителе по настоящему изобретению (например, тяжелая цепь, легкая цепь, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи).

Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR или LCVR, может быть преобразована в  
20 ген, кодирующий полноразмерную тяжелую цепь, посредством функционального связывания соответствующей ДНК, кодирующей HCVR или LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой или легкой цепи, с образованием тяжелой или легкой цепи соответственно. В данной области техники известны последовательности генов человека или других млекопитающих, кодирующих константную область тяжелой цепи. Фрагменты ДНК,  
25 охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут экспрессироваться в клетке-хозяине после функционального связывания последовательностей с последовательностью управления экспрессией. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде  
30 эписом, либо в составе хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, кодирующие устойчивость, например, к тетрациклину, неомицину и дигидрофолатредуктазе, для обеспечения возможности обнаружения клеток, трансформированных посредством желательных последовательностей ДНК. Векторы, содержащие представляющие  
35 интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела и последовательности управления экспрессией), могут быть перенесены в клетку-хозяин хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Антитела по настоящему изобретению можно легко получать в клетках млекопитающих, не имеющие ограничительного характера примеры которых включают в себя клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева культивируют с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Экспрессия антител у млекопитающих, как правило, приводит к  
5 гликозилированию. Гликозилирование антител, как правило, бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению сахара, например, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном участке  
10 N-гликозилирования (например, положении 297 в IgG1 согласно нумерации IMGT или индекса EU). Сайты гликозилирования можно модифицировать для изменения гликозилирования (например, путем блокирования или уменьшения гликозилирования или изменения аминокислотной последовательности для получения дополнительного или разнообразного гликозилирования).

15 Экспрессия антител, принадлежащих к подклассам IgG, у млекопитающих может приводить к отсечению C-концевых аминокислот одной или обеих тяжелых цепей; например, для антител IgG1 можно удалить одну или две C-концевые аминокислоты. Для антител IgG1, если присутствует C-концевой лизин, он может быть отсечен или вырезан из тяжелой цепи во время экспрессии. Кроме того, предпоследний глицин также может быть отсечен или вырезан из  
20 тяжелой цепи.

Экспрессия антител у млекопитающих также может приводить к модификации N-концевых аминокислот. Например, когда наиболее N-концевая аминокислота тяжелой цепи или легкой цепи представляет собой глутамин, она может быть модифицирована в пироглутаминовую кислоту.

25 Антитело по настоящему изобретению или содержащую его фармацевтическую композицию можно вводить парентеральными путями, не имеющими ограничительного характера примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело по настоящему изобретению может быть введено пациенту с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами в виде однократной или многократных доз.  
30 Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и могут содержать антитело, как описано в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

### Применения вариантов осуществления антител по настоящему изобретению

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела против человеческого эпирегулина по настоящему изобретению могут использоваться при лечении болевых расстройств.

5 В настоящем документе термины «болевое расстройство» или «болевые расстройства» относятся к нежелательным состояниям, возникающим в результате состояний с чрезмерной и/или хронической болью, при которых ингибирование эпирегулина приводит к более сбалансированным и менее патологическим болевым состояниям. Примеры болевых расстройств, которые предполагается лечить антителами по изобретению, описанными в настоящем документе, 10 включают в себя хроническую боль, включая ноцицептивную, нейропатическую и смешанную боль, и, в частности, боль при остеоартрите, диабетическую периферическую нейропатическую боль или боль в пояснице, а также вызванную химиотерапией периферическую нейропатию, в частности, при состояниях хронической боли.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения антитела 15 против эпирегулина могут использоваться в диагностических целях при эпирегулин-опосредованных болевых расстройствах. В некоторых вариантах осуществления болевые расстройства представляют собой по меньшей мере одну из боли при остеоартрите (ОА), диабетической периферической нейропатической боли (DPNP) или хронической боли в пояснице (CLBP). В некоторых более конкретных вариантах осуществления болевое расстройство 20 представляет собой остеоартрит (ОА).

В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело к эпирегулину по настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Дополнительно в настоящем изобретении предложен способ лечения болевого расстройства, такого как боль при 25 остеоартрите, или диабетическая периферическая нейропатическая боль, или хроническая боль в пояснице, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения эпирегулин-опосредованных заболеваний. Более конкретно, в настоящем изобретении предложен способ 30 лечения хронического болевого расстройства, такого как боль при остеоартрите, или диабетическая периферическая нейропатическая боль, или хроническая боль в пояснице, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против эпирегулина по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложено антитело против эпирегулина по настоящему 35 изобретению для применения в терапии. Более конкретно, в настоящем изобретении предложено антитело против эпирегулина по настоящему изобретению для применения при лечении

хронического болевого расстройства, такого как боль при остеоартрите, диабетическая периферическая нейропатическая боль или хроническая боль в пояснице.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение антитела против эпирегулина по настоящему изобретению или содержащей его композиции при производстве лекарственного средства для лечения одного или более хронических болевых расстройств, таких как боль при остеоартрите, или диабетическая периферическая нейропатическая боль, или хроническая боль в пояснице.

Антитела по настоящему изобретению могут использоваться для выявления хронических болевых расстройств, при которых эпирегулин может способствовать этиопатогенезу расстройства. В дополнительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения хронического болевого расстройства у пациента. Указанные способы включают стадии приведения в контакт взятого у пациента образца с антителом против эпирегулина и обнаружения связывания между человеческим эпирегулином в образце пациента и антителом; и диагностику пациента как имеющего; подверженного риску; нуждающегося в лечении; и/или подверженного риску по развитию симптомов, связанных с эпирегулин-опосредованным расстройством, когда в образце пациента обнаруживается присутствие эпирегулина выше референсного значения, наблюдаемого у индивидов без заболевания. В соответствии с некоторыми более конкретными вариантами осуществления способов лечения, представленных в настоящем документе, указанные способы дополнительно включают стадии определения референсного значения, включая дополнительные стадии приведения в контакт контрольного стандарта с первым антителом, которое связывает ту же первую область эпитопа эпирегулина, которая используется при приведении в контакт с образцом пациента; приведения контрольного стандарта в контакт со вторым антителом, имеющим детектируемую метку и связывающим ту же вторую область эпитопа эпирегулина, которая используется при приведении в контакт с образцом пациента; и обнаружения сигнала, обеспечиваемого детектируемым сигналом. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против эпирегулина содержит комбинацию LC и HC CDR, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления второе антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления хроническое болевое расстройство представляет собой одно из боли при остеоартрите, диабетической периферической нейропатической боли или хронической боли в пояснице. В некоторых вариантах осуществления образец пациента представляет собой один из образцов CSF, крови, сыворотки, лизата ткани или плазмы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает стадии приведения в контакт образца пациента со вторым антителом против эпирегулина, которое связывает вторую область эпитопа эпирегулина и имеет детектируемую метку, и обнаружения сигнала, обеспечиваемого детектируемым сигналом. В дополнительных вариантах осуществления второе антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах



осуществления второе антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления первое и второе антитела к эпирегулину не связываются друг с другом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем изобретении  
5 предложен способ обнаружения эпирегулина в образце пациента, включающий стадии приведения в контакт образца пациента с первым антителом, которое связывает первую область эпитопа эпирегулина; приведение образца пациента в контакт со вторым антителом, которое связывает вторую область эпитопа эпирегулина и имеет детектируемую метку; и обнаружение сигнала, обеспечиваемого упомянутой детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления  
10 образец пациента представляет собой один из крови, сыворотки, лизата ткани или плазмы. В соответствии с некоторыми более конкретными вариантами осуществления первая область эпитопа эпирегулина частично перекрывается со второй областью эпитопа эпирегулина. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления упомянутые стадии приводят в контакт с первым и вторым антителами происходят одновременно. В некоторых конкретных вариантах  
15 осуществления первое антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления первое антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения  
20 предложен способ количественного определения эпирегулина в образце пациента. Упомянутый способ включает стадии приведения образца пациента в контакт с первым антителом, которое связывает первую область эпитопа эпирегулина; приведения образца пациента в контакт со вторым антителом, которое связывает вторую область эпитопа эпирегулина и имеет упомянутую детектируемую метку; и обнаружения сигнала, обеспечиваемого упомянутой детектируемой меткой; приведения контрольного стандарта в контакт с первым антителом, которое связывается с  
25 той же первой областью эпитопа эпирегулина (которая используется при контакте с образцом пациента); приведения контрольного стандарта в контакт со вторым антителом, которое связывает такую же вторую область эпитопа эпирегулина (которая используется при контакте с образцом пациента) и имеет детектируемую метку; и обнаружения сигнала, обеспечиваемого упомянутым детектируемым сигналом. В некоторых вариантах осуществления образец пациента представляет  
30 собой один из образцов крови, сыворотки или плазмы или лизата ткани. В соответствии с некоторыми более конкретными вариантами осуществления первая область эпитопа эпирегулина частично перекрывается со второй областью эпитопа эпирегулина. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления упомянутые стадии приводят в контакт с первым и вторым антителами происходят одновременно. В некоторых конкретных вариантах осуществления первое антитело  
35 содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления первое антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1. В некоторых конкретных вариантах осуществления второе антитело содержит

комбинацию CDR LC и HC, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления второе антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1.

5 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предложен способ диагностики эпирегулин-опосредованного заболевания или расстройства. Указанный способ включает стадии приведения в контакт образца пациента с антителом против эпирегулина и обнаружения связывания между эпирегулином в образце пациента и антителом. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления способ диагностики включает диагностику пациента как имеющего; подверженного риску; нуждающегося в лечении; и/или подверженного риску развития 10 симптомов, связанных с эпирегулин-опосредованным расстройством, когда в образце пациента обнаруживается присутствие эпирегулина выше референсного значения. В соответствии с некоторыми более конкретными вариантами осуществления указанные способы дополнительно включают стадии определения референсного значения, включая стадии приведения в контакт контрольного стандарта с первым антителом, которое связывается с такой же первой областью 15 эпитопа эпирегулина, которая используется при приведении в контакт с образцом пациента; приведения контрольного стандарта в контакт со вторым антителом, имеющим детектируемую метку и связывающим ту же вторую область эпитопа эпирегулина, которая используется при приведении в контакт с образцом пациента; и обнаружения сигнала, обеспечиваемого детектируемым сигналом. В некоторых вариантах осуществления первое антитело содержит 20 комбинацию LC и HC CDR, представленных в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1. Некоторые варианты осуществления способа диагностики эпирегулин-опосредованного заболевания, предложенного в настоящем документе, дополнительно включают стадии приведения в контакт образца пациента со вторым антителом против эпирегулина, которое связывает вторую область эпитопа эпирегулина и имеет детектируемую метку; и обнаружения 25 сигнала, обеспечиваемого детектируемой меткой. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против эпирегулина содержит комбинацию LC и HC CDR, представленную в таблице 1. В дополнительных вариантах осуществления антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в таблице 1. В соответствии с конкретными 30 вариантами осуществления первая область эпитопа эпирегулина частично перекрывается со второй областью эпитопа эпирегулина. В соответствии с определенными вариантами осуществления первое и второе антитело не связываются друг с другом. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления референсное значение устанавливается на основе показателей плазмы здорового добровольца, биологических жидкостей или лизатов тканей и/или 35 определяется специалистом в данной области для соответствующей референтной группы и источника образца. В дополнительных вариантах осуществления болевое расстройство

представляет собой боль при остеоартрите, диабетическую периферическую нейропатическую боль или хроническую боль в пояснице.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предложен способ определения уровня человеческого эпирегулина в образце биологической жидкости, включающий:

- 5 (а) приведение образца биологической жидкости в контакт с диагностическим моноклональным антителом против человеческого эпирегулина или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с человеческим эпирегулином и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и
- 10 LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно, и определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно; (b) необязательно удаление любого неспецифически связанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- 15 и (с) обнаружение и/или количественное определение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связан с человеческим эпирегулином. Предпочтительно при этом упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки или плазмы или образец спинномозговой жидкости, а упомянутое приведение в контакт происходит *ex vivo*.

- 20 В вариантах осуществления изобретения пациент представляет собой человека, который был диагностирован как имеющий медицинский риск, состояние или расстройство, такие как одно из заболеваний или расстройств, описанных в настоящем документе, который нуждается в лечении антителом, описанным в настоящем документе. В тех случаях, когда расстройства, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, известны по установленным и
- 25 общепринятым классификациям, например, боль при остеоартрите, диабетическая периферическая нейропатическая боль или хроническая боль в пояснице, их классификации можно найти в различных известных источниках медицинской литературы. Например, 5-е издание «Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам» (DSM-5) или аналогичные тексты дают диагностический инструмент для выявления определенных расстройств,
- 30 описанных в настоящем документе (см. также, например, Scholz, et al., The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. Pain. 2019 January; 160(1): 53–59 и Treede et al., Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11), PAIN: 2019 January 160:19–27)). Кроме того, классификация некоторых расстройств, описанных в настоящем документе, представлена в Международной
- 35 классификации заболеваний, десятом пересмотренном издании (МКБ-10). Специалисту в данной области будет понятно, что существуют альтернативные номенклатуры, нозологические системы и системы классификации для заболеваний и расстройств, описанных в настоящем документе,

включая те, которые описаны в DSM-5 и МКБ-10 или МКБ-11, и что системы терминологии и классификации развиваются с развитием медицинской науки.

Термины «лечение», «лечить» или «проведение лечения» предназначены для обозначения всех процессов, в которых может происходить замедление, прерывание, подавление, контроль, облегчение, остановку, уменьшение или обращение вспять прогрессирования или степени тяжести существующего симптома, расстройства, состояния или заболевания, описанных в настоящем документе, но не обязательно указывают на полное устранение всех симптомов расстройства или заболевания. Лечение включает в себя введение белка, или нуклеиновой кислоты, или вектора, или композиции для лечения заболевания или состояния у пациента, в частности у человека. Лечение включает в себя введение антитела по настоящему изобретению для лечения заболевания или расстройства у человека, для которого было бы полезно снижение активности эпирегулина, и включает в себя случаи, когда упомянутое лечение обеспечивает: (a) торможение дальнейшего прогрессирования заболевания, т. е. прекращение его развития; (b) облегчение течения заболевания, т. е. обращение вспять течения заболевания или расстройства или облегчение их симптомов или осложнений; и/или (c) предотвращение появления симптомов заболевания. Лечение, как определено в настоящем документе, явным образом включает в себя снижение частоты возникновения боли, ослабление боли или одного или более симптомов боли, облегчение боли или одного или более симптомов боли, замедление развития боли. В некоторых ситуациях лечение также включает в себя устранение боли, но не обязательно модификацию вызывающего боль заболевания или состояния. В настоящем документе термин «устойчивая к терапии боль» обозначает боль, которая не поддавалась двум или более предшествующим схемам монотерапии и/или лечению с помощью двойной терапии.

Выражение «снижение частоты возникновения» боли, используемое в настоящем документе, означает любое из уменьшения продолжительности и/или частоты возникновения боли (включая, например, задержку или увеличение времени развития болевых симптомов у индивида). Как понятно специалистам в данной области, у индивидов может быть разный ответ на лечение. Лечение боли также включает в себя снижение степени тяжести боли, а также снижение потребности в других лекарственных средствах и/или количествах, обычно используемых при этом состоянии, включая, например, опиаты, и/или уменьшение необходимого количества (например, количества приемов) лекарственных препаратов или применения вариантов лечения. Выражение «облегчение боли или одного или более симптомов боли» (например, боли при остеоартрите) означает ослабление или уменьшение одного или более симптомов боли по сравнению с той ситуацией, когда не вводят антитело или композицию по настоящему изобретению. Термин «облегчение» также включает в себя сокращение или уменьшение продолжительности симптома. Термин «ослабление боли или одного или более симптомов боли» (например, боли при остеоартрите) означает уменьшение степени выраженности одного или более нежелательных клинических проявлений боли у индивида или популяции индивидов,

получающих лечение с использованием антитела или композиции в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в настоящем документе термин «задержка развития боли» означает отложенное развитие, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию и/или отсрочку прогрессирующей боли, такой как боль при остеоартрите. Такая задержка может иметь различную продолжительность в зависимости от истории болезни и/или особенностей индивидов, проходящих лечение. Как очевидно специалисту в данной области, достаточная или значительная задержка может фактически охватывать профилактику в том случае, если у индивида не развивается заболевание. Способ, с помощью которого «задерживают» развитие симптома, может представлять собой способ, который позволяет снижать вероятность развития симптома в заданный период времени и/или уменьшать степень проявления симптомов в заданный период времени по сравнению с ситуацией, когда способ не используется. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с использованием статистически достоверного числа субъектов.

Выражение «эффективное количество» означает количество антитела к человеческому эпирегулину по настоящему изобретению или содержащей указанное антитело фармацевтической композиции, которое вызывает необходимый для медицинского работника биологический или медицинский ответ или желательный терапевтический эффект в ткани, системе или организме человека. В настоящем документе термин «эффективный ответ» пациента или чувствительность пациента на лечение относится к клинической или терапевтической пользе, которую пациент получает при введении антитела по настоящему изобретению. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также от способности антитела вызывать желательный ответ у индивида. Такой желательный ответ включает в себя любую одну или более из: сниженного уровня хронической боли или ослабления признаков или симптомов болевого расстройства. Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных способов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. Эффективное количество антитела против человеческого эпирегулина по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы или многократных доз. Более того, эффективное количество антитела по изобретению можно вводить в виде многократных доз в количествах, которые были бы меньше эффективного количества, если бы их не вводили в более чем одной дозе. При определении эффективного количества для пациента лечащий врач учитывает ряд факторов, включая, без ограничений: размер пациента (например, вес или массу), площадь поверхности тела, возраст и общее состояние здоровья; конкретное заболевание или расстройство; степень, или вовлеченность, или степень тяжести заболевания или расстройства; ответ отдельного пациента; конкретное введенное соединение; режим введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим дозирования; применение сопутствующего лекарственного средства; и другие соответствующие обстоятельства, известные медицинским работникам.

Доза (включая, без ограничений, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное введение) может составлять от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. Однако предусмотрены также дозы ниже или выше доз, упомянутых в настоящем документе, в особенности с учетом рекомендаций по дозировкам, которые известны специалистам в данной области и/или которые описаны в настоящем документе. Прогресс у пациента, получающего лечение, можно контролировать путем периодической оценки и при необходимости корректировать дозу.

Потенциальным преимуществом способов, описанных в настоящем документе, является возможность достижения выраженного и/или длительного облегчения состояния у пациента, страдающего хроническим болевым расстройством, или с приемлемым профилем безопасности, включая приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательные явления, включая ответы антител против лекарственного средства, таким, что пациент в целом получает пользу от способа лечения. Более конкретно, антитела по настоящему изобретению обеспечат эффективное лечение, позволяя при этом избегать клинически нежелательных побочных эффектов, таких как кожная сыпь (Li T, Perez-Soler R. Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. Target Oncol. 2009 Apr;4(2):107-19), и/или ответов антител против лекарственных средств. Эффективность лечения по настоящему изобретению может быть оценена посредством различных конечных показателей, которые обычно используются при оценке эффективности вариантов лечения различных болевых расстройств. Необязательно могут быть использованы другие подходы к определению эффективности любой конкретной терапии по настоящему изобретению, включая, например, известные специалисту в данной области системы оценки.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На **ФИГ. 1** показаны результаты ELISA по селективности лигандов для антитела 1 (панель А) и LY 3016859 (панель В), а также продемонстрирована селективность антитела 1 к человеческому эпирегулину, но без обнаружения его связывания с другими лигандами семейства EGF (эпиген, амфирегулин, бетацеллюлин, EGF, HB-EGF и TGF $\alpha$  (TGFA)), что было определено с помощью описанного в примере 2 ELISA на специфичность лиганда. Для сравнения: LY 3016859 связывается как с эпирегулином, так и с TGF $\alpha$ .

**ФИГ. 2.** Связывание мембранного эпирегулина *in vivo* через 3 дня после введения антитела 1 (закрашенные кружки) по сравнению с контрольным антителом hIgG (закрашенный квадрат).

**ФИГ. 3.** Зависимое от времени связывание мембранного эпирегулина *in vivo* после подкожного введения антитела 1 в дозе 10 мг/кг (закрашенные квадраты) по сравнению с контрольным антителом hIgG (незакрашенные квадраты).

**ФИГ. 4.** Связывание мембранного эпирегулина *in vivo* через 3 дня после введения антитела 1 (закрашенные квадраты) по сравнению с более чем в 50 раз менее эффективным эпирегулин-связывающим антителом сравнения (незакрашенные кружки).

**ФИГ. 5.** Результаты оценки ELISA по связыванию Fab антитела 1 с указанными мутированными вариантами эпирегулина.

**ФИГ. 6.** Выравнивание эпитопов лигандов человеческого EGFR (EGF-подобных доменов) для антитела 1. Последовательности лигандов представлены в перечне аминокислотных и нуклеотидных последовательностей.

## ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предложены для иллюстрации, без ограничений, заявленного изобретения. Результаты следующих анализов демонстрируют, что приведенные в качестве примера моноклональные антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают и/или нейтрализуют человеческий эпирегулин и, следовательно, могут использоваться для лечения эпирегулин-опосредованных расстройств, описанных в настоящем документе.

### Пример 1. Создание, экспрессия и очистка антител

Панель человеческих антител против эпирегулина получают посредством иммунизации гуманизированной мыши рекомбинантным EREG (человека и яванского макака) для выявления антител, которые могут быть эффективны в нейтрализации сигнального пути эпирегулина. Мутации систематически вводят в отдельные определяющие комплементарности области (CDR) каждого антитела, и полученные библиотеки подвергаются множественным раундам селекции с уменьшением концентрации антигена, уменьшением времени связывания с антигеном и/или увеличением периодов диссоциации для выделения клонов с улучшенными аффинностями. Последовательности отдельных вариантов определяют и используют для создания комбинаторной библиотеки, которая подвергается дополнительному раунду селекции с повышенной строгостью для выявления аддитивных или синергических мутационных пар между отдельными областями CDR. Отдельные комбинаторные клоны секвенируют и определяют характеристики связывания. Этот скрининг можно проводить по отношению к человеческому или мышьяному эпирегулину для повышения аффинности к одному или более выбранным видам (например, антитела 1 к человеческому эпирегулину). Контрскрининг можно проводить по отношению к другим лигандам EGFR для сохранения селективности после конструирования. Выбранные антитела также могут быть подвергнуты мутагенезу для исправления посттрансляционных модификаций, таких как окисление метионина, с сохранением аффинности связывания с эпирегулином. Кроме того, в

антитела могут быть осуществлены замены каркасной (FW) области и CDR, чтобы вернуть эти последовательности в их состояние, присущее зародышевой линии, для снижения потенциального риска иммуногенности.

Получают сконструированные и/или оптимизированные антитела против эпирегулина, обозначаемые в настоящем документе как антитело 1, имеющее аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, а также полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи и кодирующие их нуклеотидные последовательности, представленные ниже в разделе, озаглавленном «Перечень аминокислотных и нуклеотидных последовательностей». SEQ ID NO, соответствующие этим последовательностям, а также аминокислотные последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи показаны в таблице 1.

### Экспрессия и очистка

Приведенные в качестве примера антитела против эпирегулина по настоящему изобретению могут быть экспрессированы и очищены по существу следующим образом. Антитело 1 экспрессируется в соответствующей клетке-хозяине, такой как HEK293 или CHO, временно или стабильно трансфицированной системой экспрессии для секреции антитела 1 с использованием оптимального заранее определенного векторного соотношения HC : LC или одной векторной системы, кодирующей как HC, так и LC. Экспрессионная плазмида содержит версии кДНК кодирующих LC и HC генов для антитела 1 (например, последовательность ДНК SEQ ID NO: 11, кодирующую HC примера антитела 1, представленную в таблице 1, и последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность LC в соответствии с таблицей 1, например, последовательность ДНК SEQ ID NO: 12, кодирующую LC примера антитела 1, представленную в таблице 1); и экспрессируются с помощью широко используемого и подходящего для этой цели конструктора, такого как конструктор, основанный на основных немедленно-ранних промоторах цитомегаловируса человека.

Среду, в которую было секретировано антитело по настоящему изобретению, можно очищать стандартными методиками, такими как смешанные методы ионообменной хроматографии и хроматографии гидрофобного взаимодействия. Например, среду можно наносить на колонку с белком А или G и проводить из нее элюирование посредством традиционных методов; также могут использоваться смешанные методы ионообменной хроматографии и хроматографии гидрофобного взаимодействия. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью обычных методик, включая эксклюзионную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт может быть сразу же заморожен, например, при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , или может быть лиофилизирован. Могут быть использованы различные методы очистки белка, и указанные методы известны в данной области техники и описаны, например: Deutscher, Methods in



Enzymology 182: 83–89 (1990) и Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Edition, Springer, NY (1994). Антитело 1 можно сразу же заморозить при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  или хранить при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких месяцев, или его можно лиофилизировать или хранить при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  для немедленного использования. SEQ ID NO аминокислотных последовательностей для примеров человеческих антител по настоящему изобретению представлены в таблице 1.

### **Пример 2. Характеристика антител к эпирегулину**

Регенты эпирегулина получают в виде слитных белков, отщепляют и очищают.

10 Отщепленный эпирегулин представляет собой зрелую растворимую форму, которая включает в себя дополнительные аминокислоты по сравнению с нативной формой и используется для анализов связывания и нейтрализации *in vitro* (SEQ ID NO: 22–25). Человеческий слитный эпирегулин (EREG) (SEQ ID NO: 27) также используется в анализе связывания (захватывающий реагент), а полноразмерная последовательность эпирегулина (SEQ ID NO: 26), которая имеет одну  
15 уменьшающую выделение мутацию, используется для клеточных анализов связывания и эффекторной функции.

Зрелый растворимый эпирегулин экспрессируется во временно трансфицированной культуре клеток CHO в виде отщепляемого протеазой HRV3C слитного белка, причем слияние осуществлено на С-конце с мономерной Fc человеческого IgG4 (F405Q/Y407E) (SEQ ID NO: 27).

20 Слитный белок захватывают в аффинной колонке с белком А и дополнительно очищают методом эксклюзионной хроматографии. Слитый белок расщепляют протеазой HRV3C, пропускают через аффинную колонку с белком А для удаления мономерной Fc и дополнительно очищают методом эксклюзионной хроматографии с получением зрелого растворимого эпирегулина.

### **25 Последовательности антигенов**

Отщепленный человеческий эпирегулин (SEQ ID NO:22)

GPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

Отщепленный эпирегулин яванского макака (SEQ ID NO: 23)

30 GPGVSITKNSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFYLG

Отщепленный крысиный эпирегулин (SEQ ID NO: 24)

GPGVLITKCSSDMNGYCLHGHCYLVDMSEKYCRCEVGYTGLRCEHFFLG

35 Отщепленный эпирегулин кролика (SEQ ID NO:25)

GPGVSITKCGSDMNGYCLHGQCIYLVDMSENYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

Полноразмерный человеческий эпирегулин (связанный с мембраной, с мутацией T111P)  
(SEQ ID NO: 26)

MTAGRRMEMLCAGRVPALLLCLGFHLLQAVLSTTVIPSCIPGESSDNCTALVQTEDNPRVAQVSIKCSS  
DMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCENHFFLTVPQPLSKEYVALTVILILFLITVVGSTYYF  
5 CRWYRNRKSKPKKEYERVTSGDPELPQV

Человеческий эпирегулин с мономерной Fc (SEQ ID NO: 27)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
10 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSIKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCENHFF  
LG

Последовательности зрелого эпирегулина различных видов по существу известны в данной области, и референсными последовательностями являются, например, следующие: референсная  
15 последовательность зрелого растворимого человеческого эпирегулина (NP\_001423.1 63–108), референсная последовательность зрелого растворимого эпирегулина яванского макака (также обозначаемого в настоящем документе как «макак») (XP\_005555120.1 63–108), референсная последовательность зрелого растворимого крысиного эпирегулина (NP\_067721.1 56–101) и референсная последовательность зрелого растворимого эпирегулина кролика (XP\_008265968.1 57–  
20 102). Другие номера референсных последовательностей лигандов человеческого EGFR следующие: человеческий TGF $\alpha$  (NP\_003227.1), EREG (NP\_001423.1), EPGN (NP\_001257918.1), AREG (NP\_001648.1), BTC (NP\_001720.1), EGF (NP\_001954.2), HB-EGF (NP\_001936.1).

25 **Аффинность связывания с человеческим эпирегулином**

В фазе раствора измеряют величины равновесных аффинностей связывания антитела 1 к эпирегулину человека (SEQ ID NO: 22), яванского макака (SEQ ID NO: 23), крысы (SEQ ID NO: 24) и кролика (SEQ ID NO: 25) в анализе MSD (Meso Scale Discovery) методом равновесного титрования раствора (MSD-SET) при 37 °C. (См., например, Darling RJ, Brault P-A  
30 (2005) Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions. Assay and Drug Development Technologies 2:647–657).

Прибор MSD SI6000 (Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд, США) используется для считывания планшетов MSD. Планшеты MSD для анализа готовят следующим образом. В лунки 96-луночного планшета Multi-Array (Meso Scale Discovery, номер по каталогу L15XA-3) наносят  
35 покрытие на ночь при 2–8 °C с помощью 30 мкл раствора слитного белка «мономерная Fc-человеческий эпирегулин» в PBS в концентрации 1 мкг/мл. После формирования покрытия планшеты промывают 3 раза в PBST, затем блокируют в течение 1 часа при комнатной

температуре со встряхиванием в 3% Blocker A (разбавленный в PBS 5% Blocker A, Meso Scale Discovery, номер по каталогу R93AA-1).

Образцы для SET готовят в 1% Blocker A при pH 6,0 и pH 7,4. Антитела разводят до 20 или 200 пМ (pH 7,4) либо до концентрации 200 пМ и 2 нМ (pH 6,0). Эпирегулин серийно разводят в 5 общей сложности в 12 разведениях, при этом концентрация эпирегулина приблизительно в 2 раза превышает концентрацию антитела. Это достигается использованием исходных концентраций 10 и 100 нМ (pH 7,4) или 100 нМ и 1000 нМ (pH 6,0), которые затем один раз разводят в 10 раз, серийно разводят 9 раз в 2 раза, а затем при окончательном разведении разводят в 10 раз. Титрованные растворы эпирегулина и растворы антител с фиксированной концентрацией 10 объединяют в соотношении 1 : 1 для приготовления SET-растворов. SET-растворы инкубируют при 37 °C в течение приблизительно 96 часов, чтобы уровень связывания достиг равновесия. 100 мкл SET-раствора переносят в подготовленный MSD-планшет в дублированные ряды лунок и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут для захвата свободных антител. После инкубации планшет 3 раза промывают в PBST, затем во все лунки добавляют в 15 концентрации 1 мкг/мл по 100 мкл каппа-цепи биотинилированного козьего античеловеческого первичного антитела (Southern Biotech, номер по каталогу 2060-08) в 1% Blocker A. Планшет инкубируют на шейкере для планшетов при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем планшет промывают 3 раза в PBST, затем во все лунки добавляют в концентрации 1 мкг/мл по 100 мкл стрептавидина SULFO-TAG (Meso Scale Discovery, номер по каталогу R32AD-1) в 1% 20 Blocker A. Планшет инкубируют на шейкере для планшетов при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем планшет трижды промывают PBST, затем перед считыванием планшета добавляют 100 мкл буфера 1X Read Buffer T (разбавленного в воде из 4X Read Buffer T, Meso Scale Discovery, номер по каталогу R93AA-1). Для учета неизвестной активной фракции антигена константа диссоциации ( $K_D$ ) и поправочный коэффициент по лиганду в виде наименьшего общего кратного (НОК) глобально подгоняют на основе данных анализа MSD-SET к уравнению 25 равновесия по связыванию с использованием нелинейной регрессии. Эта операция осуществляется для каждой пары фиксированных концентраций антитела при заданном pH.

При pH 7,4 антитело 1 связывается с человеческим эпирегулином с аффинностью ( $K_D$ ), равной 14,9 пМ, с эпирегулином яванского макака — с  $K_D$  26,8 пМ, с крысиным эпирегулином — 30 с  $K_D$  30,2 пМ и с эпирегулином кролика — с  $K_D$  24,0 пМ. При pH 6,0 антитело 1 связывается с человеческим эпирегулином с  $K_D$  195 пМ, с эпирегулином яванского макака — с  $K_D$  328 пМ, с крысиным эпирегулином — с  $K_D$  286 пМ и с эпирегулином кролика — с  $K_D$  330 пМ. Селективность антитела 1 по отношению к pH (pH 6,0  $K_D$  / pH 7,4  $K_D$ ) составляет 13,0 для человеческого эпирегулина, 12,2 для эпирегулина яванского макака, 9,5 для крысиного 35 эпирегулина и 13,7 для эпирегулина кролика. pH-зависимое связывание антигена может обеспечить улучшение как фармакокинетики, так и продолжительности нейтрализации мишени (см. Vincent, K. J. and M. Zurini (2012). "Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and

pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates." Biotechnol J 7(12): 1444–1450), причем антитело 1 и/или антитела по настоящему изобретению проявляют преимущественную pH-селективность при связывании эпирегулина, что, как предполагается, обеспечивает наличие полезных фармакокинетических свойств и свойства по нейтрализации эпирегулина.

**Таблица 3. Аффинность связывания антитела 1 к эпирегулину in vitro измеряли посредством MSD-SET при 37 °С, при pH 7,4 и 6,0. Значения  $K_D$  представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по 3 независимым повторностям**

Вид	pH 7,4 Аффинность (пМ)	pH 6,0 Аффинность (пМ)	Селективность ( $K_D$ при pH 6,0 / $K_D$ при pH 7,4)
Человек	14,9 $\pm$ 2,9	195 $\pm$ 43	13,0
Яванский макак	26,8 $\pm$ 10,3	328 $\pm$ 110	12,2
Крыса	30,2 $\pm$ 15,9	286 $\pm$ 47	9,5
Кролик	24,0 $\pm$ 7,3	330 $\pm$ 34	13,7

- 10 Результаты представлены как среднее значение  $K_D$  по 3 независимым повторностям. Ошибку рассчитывают как стандартное отклонение по независимым повторностям. Аффинность антитела 1 к EREG человека при pH 7,4 демонстрирует приблизительно 70-кратное улучшение аффинности относительно LY3016859, что может позволить использовать значительно более низкую дозу антитела 1, необходимую для достижения эквивалентной нейтрализации EREG in vivo.
- 15 Возможность использовать более низкую дозу антитела 1 означает, что требуемый уровень ингибирования может быть достигнут с использованием меньшего количества антитела, и в результате этого лекарственный препарат может быть пригоден для подкожного введения, что клинически важно для повышения доступности, переносимости и соблюдения режима лечения по сравнению с антителом, которое требует внутривенного дозирования. Это является особым
- 20 преимуществом в контексте постоянного дозирования, например, которое необходимо при показаниях, связанных с хронической болью, описанных в настоящем документе.

#### **Лигандная специфичность антитела 1**

- 25 Специфичность связывания антитела с лигандами семейства EGF можно тестировать с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) и/или других обычных методов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Приготовление реагентов для ELISA можно проводить следующим образом.

Тестируемыми лигандами являются человеческий эпиген (R&D 6629-EP-025/CF), эпирегулин ((SEQ ID NO: 22), полученный и очищенный так, как описано в настоящем документе в примере 2, и/или способами, известными в данной области техники), амфирегулин (R&D 262 -AR-100/CF), бетацеллюлин (R&D 261-CE-010/CF), EGF (R&D 236-EG-200), HB-EGF (R&D 259-HE-050/CF) и TGF $\alpha$  (R&D 239- A-100). Затем лиганды биотинилируют 10-кратным избытком биотина с использованием реагента Thermo Pierce Sulfo-NHS-LC-Biotin (A39257) в течение 2 часов на льду, замораживают при -80 °C в виде небольших аликвот для индивидуального использования.

Анализы ELISA можно проводить следующим образом. Лунки 96-луночных планшетов Greiner с высокой степенью связывания (650061) покрывают (50 мкл/лунка) нейтравидином (Thermo-Pierce 31000) в концентрации 1 мкг/мл в PBS и оставляют на ночь при 4 °C. На следующий день раствор для покрытия удаляют, добавляют (100 мкл/лунка) Pierce Blocker Casein (37528) и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут или более, чтобы блокировать планшеты. После блокирования планшеты промывают 3 раза PBS плюс 0,05% Tween 20 для удаления остатков блокирующего буфера. Биотинилированные лиганды разводят в отдельном ПЦР-планшете (Eppendorf 951020443) в блокирующем растворе Pierce Casein Blocker при постоянной концентрации каждого лиганда, равной 20 нМ, в 12 лунках без контрольного антигена в последнем ряду. Лиганды переносят на блокированный аналитический планшет и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. Аналитический планшет промывают 3 раза PBS плюс 0,05% Tween 20. Тестируемое антитело последовательно разводят, начиная с 5 мкг/мл (LY3016859) или 10 мкг/мл (антитело 1), в блокирующем растворе Pierce Casein Blocker с разведениями в соотношении 1 : 3 по всему планшету (12 лунок) с конечным объемом 50 мкл/лунка и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. Аналитический планшет промывают 3 раза PBS плюс 0,05% Tween 20. Содержащее цепь каппа-AP вторичное античеловеческое антитело (Southern Biotech 2060-04) добавляют в количестве 50 мкл/лунка в разведении 1 : 2000 в PBS плюс 0,05% Tween 20 и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. Аналитический планшет промывают 3 раза PBS плюс 0,05% Tween 20. В конце добавляют 50 мкл субстрата pNPP (Sigma-Aldrich N2765) и оставляют до появления достаточной окраски, после чего считывают на длине волны 405 нм на считывающем устройстве для планшетов Spectramax Plus 384 от компании Molecular Devices.

На Фиг. 1 представлены результаты ELISA по лиганд-селективности для антитела 1.

Антитело 1 демонстрирует селективность в отношении связывания человеческого эпирегулина, но не обнаруживает явного связывания с другими лигандами семейства EGF (эпигеном, амфирегулином, бетацеллюлином, EGF, HB-EGF и TGF $\alpha$ ), как было определено в упомянутом выше ELISA по лиганд-специфичности. Избирательное и специфическое связывание с эпирегулином, а не с другими лигандами семейства EGF, указывает на то, что с помощью антитела 1 можно достигать желательных эффектов блокирования сигнального пути эпирегулина, избегая

при этом клинически нежелательных эффектов, возникающих при связывании с другими лигандами семейства EGF, такими как TGF $\alpha$  или другие. Отсутствие связывания с TGF $\alpha$  может приводить к снижению дозы, необходимой для эффективного ингибирования эпирегулина. Такая селективность позволяет избежать нежелательных клинических явлений, таких как кожная сыпь, которые наблюдались при применении ингибиторов пан-EGFR (неселективных ингибиторов EGFR, т. е. блокирующих связывание EGFR со всеми его лигандами).

### Физико-химические свойства

Что касается терапевтических свойств полученного антитела, включая химическую стабильность, растворимость и вязкость, антитело 1 демонстрирует желаемую комбинацию физико-химических свойств для использования в качестве терапевтического агента при лечении людей.

### Стабильность

Стабильность антитела 1 оценивают при высокой концентрации (приблизительно 100 мг/мл), полученной в 5 мМ гистидина, pH 6,0, плюс 280 мМ маннита плюс 0,05% (масс./об.) полисорбата 80. Концентрированные образцы инкубируют в течение 4 недель при 5 °C и 35 °C. После инкубирования образцы анализируют для определения процента высокомолекулярных соединений (% HMW) методом эксклюзионной хроматографии (SEC) для фрагментации посредством капиллярного электрофореза (CE-SDS) и для химической модификации (например, дезамидирования, изомеризации или окисления) с помощью картирования пептидов методом ЖХ-МС. Через 4 недели при 35 °C антитело 1 демонстрировало  $\Delta$ % HMW (изменение процента массы высокомолекулярных соединений), равный 0,4%,  $\Delta$ % фрагментов (изменение процента фрагментов), равный 0,6%, и отсутствие химических модификаций CDR более 0,5%.

Фотостабильность при одинаковых условиях получения состава оценивают по суммарному воздействию УФ-излучения в 40 Ватт-час/м<sup>2</sup> и видимого света в 240 килолюкс-час при 25 °C. После инкубирования образцы анализируются на % HMW методом SEC и на химическую модификацию посредством пептидного картирования методом ЖХ-МС. Антитело 1 демонстрировало  $\Delta$ % HMW, измеренное методом SEC, равное 6,1%, а также в нем отсутствовали химические модификации CDR более 0,7% по сравнению с контролем без воздействия.

Стабильность при замораживании/оттаивании при одинаковых условиях получения состава оценивают с использованием 3 повторных медленных циклов с контролируемой температурой, которые имитируют условия замораживания/оттаивания больших объемов нерасфасованного лекарственного вещества, помещенного при -70 °C. Антитело 1 демонстрировало  $\Delta$ % HMW, измеренное методом SEC, равное 1,0%, после 3 циклов замораживания-оттаивания.

Эти результаты показывают, что антитело 1 обладает преимущественной физической и химической стабильностью, достаточной для облегчения разработки составов растворов и использования в качестве терапевтического агента.

## 5 Растворимость

Растворимость оценивают посредством концентрирования 100 мг антитела 1 с помощью центробежного фильтра с отсечкой по молекулярной массе от 30 кДа (например, Amicon U.C. filters, компания Millipore, номер по каталогу UFC903024) до объема приблизительно 0,5 мл. Конечную концентрацию образца измеряют по УФ-поглощению на длине волны 280 нм с использованием спектрофотометра Solo VPE (C Technologies, Inc).

Антитело 1 демонстрирует растворимость более или равную 175 мг/мл в 5 мМ гистидинового буфера с pH 6 и более или равную 168 мг/мл в PBS с pH 7,4. Никакого фазового разделения или криоосаждения не наблюдается через 1 неделю хранения при 5 °C или при -5 °C. Эти результаты показывают, что антитело 1 демонстрирует достаточную растворимость, чтобы обеспечить дозирование в высоких концентрациях.

## Вязкость

Вязкость антитела 1 и LY3016859 анализируют при 15 °C при приблизительно концентрации 125 мг/мл с использованием вискозиметра VROC Initium (RheoSense). Антитело 1 демонстрировало вязкость 6,4 сП при концентрации 133 мг/мл в 5 мМ гистидина с pH 6 плюс 280 мМ маннита, а LY3016859 демонстрировало вязкость в 12,2 сП при концентрации 132 мг/мл в 5 мМ гистидина с pH 6 плюс 280 мМ маннита. Эти результаты показывают, что антитело 1 обладает пониженной вязкостью относительно LY3016859 и достаточно низкой вязкостью, чтобы обеспечить дозирование в высоких концентрациях. Возможность использования более высокой концентрации антитела 1 в комбинации с необходимостью введения более низкой дозы означает, что необходимые эффективные дозы могут быть получены в меньшем объеме для доставки, а это означает, что лекарственный препарат может быть пригоден для подкожного введения, что клинически важно с точки зрения улучшения доступности, переносимости и соблюдения режима лечения по сравнению с агентом, представляющим собой антитело, требующее внутривенного дозирования.

### **Пример 3. Функциональная характеристика *in vitro* антител к человеческому эпирегулину**

#### **Нейтрализация эпирегулина *in vitro***

Нейтрализация активности эпирегулина антителами по настоящему изобретению, такими как антитело 1, может быть оценена с помощью одного или более анализов индуцированного эпирегулином клеточного ответа, как описано ниже.

Антитела по настоящему изобретению тестируют на способность нейтрализовать активность эпирегулина в двух независимых функциональных анализах. Нейтрализация активности эпирегулина антителом 1 по настоящему изобретению может быть оценена с помощью одного или более анализов клеточной активности с использованием последующих сигнальных путей семейства рецепторов EGFR, как описано ниже. Определение средней полумаксимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ) для анализов нейтрализации (C166-AP1-Luc и TGW-pERK) осуществляют в SigmaPlot или GraphPad Prism. В GraphPad Prism  $IC_{50}$  рассчитывают посредством проведения нелинейного регрессионного анализа  $\text{Log}_{10}$ -преобразованной концентрации антител. Для анализов, проводимых на 1 планшете только в двух или трех повторностях,  $IC_{50}$  и стандартное отклонение (ст. откл.) определяют посредством расчета  $IC_{50}$  для каждой повторности, а ст. откл. — на основе усредненного значения  $IC_{50}$  по повторностям. Для анализа соединений на различных планшетах в двух или трех повторностях  $IC_{50}$  рассчитывают для каждого планшета, а ст. откл. определяют на основе значений для всех планшетов.

20

#### **Ингибирование индуцированных эпирегулином ответов в функциональном анализе C166-AP1-люциферазы**

Способность антител по настоящему изобретению нейтрализовать индуцированную человеческим эпирегулином активность люциферазного репортера можно оценивать в клетках C166, сверхэкспрессирующих люциферазный репортер посредством активации AP1 (C166-AP1-Luc). Клетки C166 представляют собой клеточную линию эндотелиального происхождения, которая экспрессирует все 4 рецептора семейства EGFR, причем EGFR экспрессируется на самом высоком уровне. Для тестирования активности антитела 1 клетки C166-AP1-Luc выращивают в среде для выращивания [DMEM (Gibco 12430-047), 10% FBS (Gibco 10082147), Anti/Anti (Gibco 15240062) и 2 мкг/мл Puго (1000x 2 мг/мл дигидрохлорида пурамицина (Calbiochem, номер по каталогу 540411)] и диссоциируют в 0,05% трипсин-PBS, а затем высевают по 50 000 клеток на 1 мл в обработанные для тканевого культивирования 96-луночные планшеты по 50 мкл на лунку в бессывороточной среде (среда для выращивания без FBS). Клетки обрабатывают 50 мкл эпирегулина в конечной концентрации 100 нг/мл (16–18,5 нМ) (человека (SEQ ID NO: 22), яванского макака (SEQ ID NO: 23), крысы (SEQ ID NO: 24) и кролика (SEQ ID NO: 25), как описано в настоящем документе выше), а также проводят последовательные разведения концентраций антитела 1 в течение 6 ч. После инкубации клетки лизируют в течение 3 минут

35



100 мкл раствора люциферазы Promega™ One-Glo™ (Promega™, номер по каталогу E6120). Люминесценцию считывают с помощью считывателя микропланшетов Perkin Elmer Wallace 1420 Victor2™. Снижение количества относительных единиц флуоресценции (ОЕФ), показанное ниже в таблице 4, отражает способность антитела 1 нейтрализовать активность эпирегулина различных релевантных протестированных видов, включая эпирегулин человека (SEQ ID NO: 22), яванского макака (SEQ ID NO: 23), крысы (SEQ ID NO: 24) и кролика (SEQ ID NO: 25). Значение IC<sub>50</sub> для антитела 1 при нейтрализации человеческого эпирегулина составляет 8,7 нМ, ст. откл. 2,3, n = 5 планшетов, 2–3 повторности/планшет (таблица 4). Нейтрализация релевантных видов эпирегулина продемонстрирована тестированием на яванском макаке (IC<sub>50</sub> 2,1 нМ, ст. откл. 0,08, n = 3 повторности), крысе (IC<sub>50</sub> 2,5 нМ, ст. откл. 0,27, n = 3 повторности), кролике (IC<sub>50</sub> 3,6 нМ, ст. откл. 0,14, n = 3 повторности). Валидация результатов анализа и сниженная IC<sub>50</sub> антитела 1 по сравнению с LY3016859 (антитело 1 из WO 2012/138510) были подтверждены данными по нейтрализации человеческого эпирегулина в этом анализе с LY3016859 (таблица 4). Эпирегулин человека, кролика, яванского макака и кролика, использованный в этих исследованиях, получали так, как описано выше. Было продемонстрировано, что LY3016895 нейтрализует человеческий эпирегулин с IC<sub>50</sub> 25,9 нМ, ст. откл. 11,7, n = 8 планшетов, 2–3 повторности/планшет, яванского макака (IC<sub>50</sub> 8,6 нМ, ст. откл. 0,27, n = 2 планшета, 2–3 повторности/планшет), крысы (IC<sub>50</sub> 720 нМ, ст. откл. 10, n = 2 планшета, 2–3 повторности/планшет) и кролика (IC<sub>50</sub> 11,0 нМ, ст. откл. 1,15, n = 2 планшета, 2–3 повторности/планшет). Статистическая валидация анализа индуцированной эпирегулином C166-API-Luc позволяли определить, что MSR составляет 1,24, 95%-й ДИ по MSR (MSR = минимально значимое соотношение) составляет 1,15, 1,43, а активность антитела 1 составляет 8,4 +/- 1,3. Этот анализ демонстрирует *in vitro* нейтрализацию антителом 1 индуцируемых эпирегулином функциональных клеточных ответов и способность антитела 1 ингибировать активность эпирегулина различных видов, а также потенциальную возможность нейтрализующих эффектов антитела 1 против эпирегулина *in vivo*.

**Таблица 4. Нейтрализация антителом 1 эпирегулина индуцированной репортерной активности люциферазы в клетках C166-AP1-люциферазы**

	Антитело 1 IC <sub>50</sub> ± ст. откл. (нМ)	LY3016859 IC <sub>50</sub> ± ст. откл. (нМ)
Человеческий эпирегулин	8,7 ± 2,3	25,9 ± 11,4
Эпирегулин яванского макака	2,1 ± 0,1	8,6 ± 0,3
Эпирегулин крысы	2,5 ± 0,3	720 ± 10
Эпирегулин кролика	3,6 ± 0,1	11,0 ± 1,2

По нейтрализации человеческого эпирегулина среднее значение и ст. откл. определяли посредством усреднения IC<sub>50</sub> из повторностей на 5 планшетах для антитела 1 и 8 планшетах для LY3016859. По нейтрализации эпирегулина крысы, яванского макака и кролика IC<sub>50</sub> из трех повторностей на 1 планшете для каждого вида усредняли и определяли ст. откл. для антитела 1. По нейтрализации эпирегулина крысы, яванского макака и кролика IC<sub>50</sub> получали посредством усреднения IC<sub>50</sub> из двух повторностей на 2 разных планшетах для LY3016859.

Данные в таблице 4 демонстрируют, что антитело 1 может эффективно нейтрализовать индуцированную человеческим эпирегулином активность люциферазного репортера в вышеуказанном клеточном анализе C166-AP1-люцифераза (IC<sub>50</sub> = 8,7 нМ), при этом IC<sub>50</sub> приблизительно в 3 раза ниже, чем у LY3016895 (IC<sub>50</sub> = 25,9 нМ). Перекрестная реактивность к соответствующим видам эпирегулина была подтверждена посредством тестирования нейтрализации крысиного эпирегулина (IC<sub>50</sub> = 2,5 нМ), эпирегулина яванского макака (IC<sub>50</sub> = 2,1 нМ) и кролика (IC<sub>50</sub> = 3,6 нМ). Эти данные подтверждают способность антитела 1 нейтрализовать опосредованную человеческим эпирегулином передачу сигналов и лечить заболевания человека, в этиопатогенез которых вносит вклад эпирегулин-опосредованная передача сигналов, такие как болевые расстройства, в частности ОА, DPNP и CLBP.

#### **Селективность антитела 1 при нейтрализации эпирегулина в анализе C166-AP1-Luc**

Селективность антитела 1 в отношении нейтрализации эпирегулина можно дополнительно продемонстрировать посредством тестирования активности всех 7 лигандов EGFR (эпиген, TGFα, BTC, EGF, HB-EGF, эпирегулин и амфирегулин) в анализе C166-AP1-Luc (лиганды могут быть приобретены, например, в компании R&D systems: эпирегулин № 1195-EP-CF, бетацеллюлин № 261-CE-CF, EGF № 236-EG-CF, TGFα № 239-A-CF, HB-EGF № 259-HE-CF, эпиген № 6629-EP-CF и амфирегулин № 262-AR-CF). Эти 7 лигандов EGFR демонстрируют активацию AP1 с увеличением активности люциферазы в 2–5 раз в зависимости от лиганда. EC<sub>50</sub> для лигандов

EGFR определяют посредством анализа ответов на дозы каждого лиганда в клеточной линии C166-AP1-Luc, как описано в настоящем документе выше. Концентрацию лиганда для стимуляции определяют с использованием значений  $EC_{50}$ – $EC_{80}$  для каждого лиганда (бетацеллюлин 0,8 нМ, EGF 1,3 нМ,  $TGF\alpha$  2,5 нМ, HB-EGF 0,52 нМ, эпирегулин 16 нМ, эпиген 333 нМ и амфирегулин 181 нМ; для эпигена и амфирегулина оценивали  $EC_{50}$  из-за отсутствия плато на кривой). Антитело 1 демонстрирует способность нейтрализовать индуцированную эпирегулином активность люциферазы в клетках C166-AP1-Luc с  $IC_{50}$  8,7 нМ и, наоборот, не демонстрирует ингибирование бетацеллюлин-, EGF-,  $TGF\alpha$ -, HB-EGF-, эпиген- или амфирегулин-индуцированной активности люциферазы в анализе C166-AP1-Luc (см. таблицу 5 ниже). Данные в таблице 5 также подтверждают фармакологическую селективность антитела 1, так как оно специфически нейтрализует активность эпирегулина, но не других членов семейства: бетацеллюлина, EGF,  $TGF\alpha$ , HB-EGF, эпигена и амфирегулина. Данная селективность важна, так как ожидается, что антитело 1 будет избирательно вмешиваться в ответы эпирегулина и, таким образом, позволять предотвращать возможные нежелательные эффекты, которые могут развиваться при использовании менее специфичных агентов, таких как LY3016859, которые могут блокировать другие лиганды EGFR.

**Таблица 5.** Селективность антитела 1 при нейтрализации эпирегулина в анализе C166-AP1-Luc. Все 7 лигандов EGFR тестируют на расчет  $EC_{50}$  в анализе C166-AP-Luc. Н/А (нет активности) указывает на отсутствие кривой ингибирования при определении  $IC_{50}$  и, следовательно, на отсутствие нейтрализации при самой высокой концентрации тестируемого антитела — 200 нМ.  $IC_{50}$  при нейтрализации эпирегулина рассчитывали с использованием реагента эпирегулина (SEQ ID NO: 22).

	Лиганд $EC_{50}$ , нМ	Антитело 1 $IC_{50}$ , нМ
бетацеллюлин	0,8	Н/А
EGF	1,3	Н/А
$TGF\alpha$	2,5	Н/А
HB-EGF	0,13	Н/А
эпирегулин	7,8	8,7
Эпиген	429	Н/А
амфирегулин	42,9	Н/А

**Способность антитела 1 нейтрализовать индуцированные эпирегулином ответы в клеточной линии нейробластомы TGW**

Нейтрализацию эпирегулина дополнительно оценивают посредством измерения уровня индуцированного эпирегулином фосфорилирования ERK в клеточной линии нейробластомы TGW. Клетки TGW экспрессируют все 4 рецептора семейства EGFR, причем экспрессия EGFR проводится на самом высоком уровне. В данном анализе клетки TGW выращивают в планшетах, покрытых коллагеном 1, в среде для выращивания [DMEM с высоким содержанием глюкозы с NADPYR (Gibco № 11995-065), 1x NEAA (Gibco № 11140-050), Glutamax (Gibco № 35050-061) и 1x Anti-Anti (Gibco № 15240-062)]. Клетки диссоциируют в 0,05% растворе трипсин-PBS и высевают в бессывороточную среду (среда для выращивания, в которой FBS заменена на 0,1% BSA) в количестве 100 000 клеток / 100 мкл в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном 1 (Corning № 354407). В клетках TGW обработка эпирегулином (80 нг/мл в течение 5 минут) индуцирует более чем 5-кратное увеличение фосфорилирования ERK (Meso Scale Diagnostics, LLC, набор phospho-ERK1/2 Whole Cell Lysate Kit № K151DWD) по сравнению с нестимулированными клетками. Активация фосфо-ERK определяется посредством индукции хемилюминесцентного ответа и отображается в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Активность антитела 1 по нейтрализации определяют посредством инкубации человеческого эпирегулина с антителом 1 в последовательных разведениях в течение 20 минут перед стимуляцией клеток. Данные получают посредством считывания планшетов на устройстве Meso Scale Diagnostics SECTOR Imager. Уменьшение индуцированного эпирегулином сигнала фосфо-ERK1/2 при обработке антителом 1 приведено в таблице 6 и отражает способность антитела 1 нейтрализовать человеческий эпирегулин. Значение IC<sub>50</sub> для антитела 1 при нейтрализации индукции pERK, индуцированной человеческим эпирегулином в клетках TGW, составляет 3,4 нМ, ст. откл. 0,7 (n = 2 повторности), что ниже, чем у LY3016859 с IC<sub>50</sub> 14,6 нМ, ст. откл. 0,7 (n = 2 повторности). Данные в таблице 6 свидетельствуют о способности антитела 1 блокировать индуцированную человеческим эпирегулином активацию фосфо-ERK1/2 в клетках TGW. Эти данные демонстрируют способность антител по настоящему изобретению и, в частности, антитела 1 нейтрализовать человеческий эпирегулин, причем данные получены с использованием двух разных клеточных линий с независимыми результатами, и подтверждают возможность терапевтического применения этих антител при лечении эпирегулин-опосредованных расстройств, таких как хронические болевые расстройства.

**Таблица 6. Антитело 1 нейтрализует эффект индукции фосфо-ERK, индуцированной человеческим эпирегулином в клетках TGW**

Антитело 1 IC <sub>50</sub> ± ст. откл. (нМ)	LY3016859 IC <sub>50</sub> ± ст. откл. (нМ)
---	---

Человеческий эпирегулин	3,4 ± 0,7	14,6 ± 0,7
----------------------------	-----------	------------

**Пример 4. Функциональная характеристика эпирегулина *in vivo* при индуцированной тактильной аллодинии у мышей CD-1**

Способность биологически активных молекул эпирегулина и TGF $\alpha$  индуцировать тактильную аллодинию можно оценивать на самцах мышей CD-1 после внутривидовой инъекции. Мышам позволяют привыкнуть в помещении для животных с контролируемой температурой и освещением с неограниченным количеством воды и еды в течение периода, составляющего по меньшей мере 7 дней до начала экспериментов. В дни тестирования животных доставляют в комнату для тестирования, позволяют привыкнуть в течение 20 минут в домашней клетке, а затем помещают в прозрачные пластиковые камеры на приподнятый пол из металлической сетки и позволяют привыкнуть в течение одного часа. Ответы в виде отдергивания лапы на механическую стимуляцию определяют с помощью калиброванных нитей фон Фрея, прикладываемых к подошвенной поверхности задней лапы крысы из-под клетки через отверстия в металлической сетке пола. Измерения выполняются с использованием нитей фон Фрея по схеме тестирования «вверх-вниз». Диапазон силы воздействия восьми градуированных нитей составляет от 0,04 до 6 г. Измеряют и рассчитывают порог отдергивания лапы. Животных рандомизируют на основании исходного значения порога отдергивания лапы и распределяют на группы дозирования PBS, 30 нг эпирегулина, 300 нг эпирегулина, 30 нг TGF $\alpha$  или 300 нг TGF $\alpha$  (реагенты мышинового эпирегулина (SEQ ID NO: 28) и мышинового TGF $\alpha$  (SEQ ID NO: 29) готовили так, как описано в настоящем документе, или в случае с TGF $\alpha$  использовали His-метки с последующей очисткой стандартными методами хроматографии (аффинная хроматография с иммобилизованными ионами металлов или ИМАС с последующей эксклюзионной хроматографией, или SEC). Затем животным в заднюю лапу выполняют внутривидовую инъекцию 20 мкл раствора PBS или свежеразведенного эпирегулина или TGF $\alpha$ . Пороги отдергивания лапы оценивают через 2 часа и 4 часа после инъекции. Данные представлены в таблице 7 ниже.

**Таблица 7.**

	Порог отдергивания лапы (г)		
	Среднее значение ± ст. ош. среднего (n)		
	Исходный уровень	2 ч	4 ч
Несущая среда	2,55 ± 0,50 (10)	2,34 ± 0,36 (10)	2,27 ± 0,49 (10)
30 нг эпирегулина	2,58 ± 0,46 (10)	1,91 ± 0,32 (10)	1,56 ± 0,34 (10)
300 нг эпирегулина	2,58 ± 0,47 (10)	1,05 ± 0,49 (10)	1,32 ± 0,47 (10)

30 нг TGF $\alpha$	2,57 $\pm$ 0,49 (10)	2,50 $\pm$ 0,52 (10)	3,13 $\pm$ 0,50 (10)
300 нг TGF $\alpha$	2,61 $\pm$ 0,50 (10)	2,67 $\pm$ 0,53 (10)	2,40 $\pm$ 0,63 (10)

Эффект воздействия эпирегулина по сравнению с TGF $\alpha$  показан выше в таблице 7, и данные указывают на то, что в этой модели боли эпирегулин индуцирует болезненный ответ, на что указывает снижение порога отдергивания лапы, тогда как для TGF $\alpha$  такого эффекта не наблюдается. Считается, что антитело 1 является более селективным и специфическим болеутоляющим терапевтическим средством по сравнению с LY3016859, которое распознает как эпирегулин, так и TGF $\alpha$ , а отсутствие связывания с TGF $\alpha$  антителом 1 по настоящему изобретению считается преимуществом в отношении предотвращения нецелевых эффектов, снижения иммуногенности и улучшения или снижения дозы, которая может потребоваться для терапевтических вариантов применения.

### **Пример 5. Характеристика потенциала иммуногенности антитела 1**

Антитело 1 представляет собой терапевтическое антитело, улучшенное в нескольких комбинированных аспектах, включая повышенную аффинность к человеческому эпирегулину, улучшенную специфичность эпирегулина относительно других лигандов EGFR и по сравнению с LY3016859 улучшенные биофизические свойства и полностью человеческую последовательность, причем считается, что последняя особенность обеспечивает сниженный потенциал иммуногенности, что подтверждается представленными далее данными.

#### **Анализ интернализации дендритных клеток (DC)**

##### *Культивирование полученных из моноцитов DC (MDDC)*

Моноциты CD14<sup>+</sup> выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), культивируют и дифференцируют в DC по стандартным протоколам. Вкратце, PBMC выделяют центрифугированием в градиенте плотности с Ficoll (№ 17-1440-02, GE Healthcare) и Sepmate 50 (№ 15450, STEMCELL Technologies) из LRS-WBC (белых клеток крови, собранных с помощью системы удаления лейкоцитов). Моноциты CD14<sup>+</sup> выделяют методом положительной селекции с использованием набора микрогранул CD14<sup>+</sup> (№ 130-050-201, Miltenyi Biotec) в соответствии с руководством производителя. Затем клетки культивируют в концентрации 1 миллион/мл с GM-CSF в концентрации 1000 ЕД/мл и IL-4 в концентрации 600 ЕД/мл в течение 6 дней для доставки к незрелым дендритным клеткам (MDDC) в среде RPMI с L-глутамином и 25 мМ HEPES, дополненной 10% FBS, 1 мМ пирувата натрия, раствором 1х пенициллина-стрептомицина, раствором 1х заменимых аминокислот и 55 мкМ 2-меркаптоэтанола (далее называется полной средой RPMI или средой, приобретенной в компании Life Technologies). Среду меняют дважды: на 2-й и 5-й дни. На 6-й день клетки осторожно собирают скребком для клеток и используют в

эксперименте. MDDC визуально определяют на предмет дендритной морфологии под микроскопом, а на экспрессию CD14, CD11c и HLA-DR — посредством проточной цитометрии. Способность клеток реагировать на обработку ЛПС подтверждается измерением повышения экспрессии CD80, CD83 и CD86 методом проточной цитометрии.

5

#### *Конъюгация Fab-TAMRA-QSY7*

Фрагмент F(ab')<sub>2</sub> козьего античеловеческого IgG (Jackson ImmunoResearch) дважды метят QSY7-NHS и TAMRA-SE (молекулярные зонды) для получения Fab-TAMRA-QSY7, применяемого в качестве универсального зонда для отслеживания интернализации тестового продукта. В каждой

10 виале F(ab')<sub>2</sub> (приблизительно 1 мл с концентрацией 1,3 мг/мл) концентрируют до приблизительно 2 мг/мл посредством центрифугирования при 14 000 RCF в течение 2 минут с использованием центробежного фильтрующего устройства Amico Ultra-0.5 (№ UFC501096, Millipore). pH доводят до основного (pH > 8) с помощью 10% (об./об.) 1 М бикарбоната натрия, добавляют 6,8 мкл маточного раствора QSY-NHS (10 мМ) в DMSO и перемешивают. Реакционную виалу

15 выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Промежуточный продукт Fab-QSY7 очищают на обессоливающей колонке Zeba Spin (№ 89890, Thermo Scientific) посредством центрифугирования в течение 2 мин при относительном центробежном ускорении (RCF), равном 1000. Концентрацию и степень мечения (DOL) рассчитывают посредством измерения оптической плотности при 280 нм и 560 нм на NanoDrop (ThermoFisher). Затем Fab-

20 QSY7 снова концентрируют до приблизительно 2 мг/мл посредством центрифугирования при 14 000 RCF в течение 2 минут с помощью центробежного фильтрующего устройства Amico Ultra-0.5. После корректировки pH с помощью 10% (об./об.) 1 М бикарбоната натрия добавляют 4,3 мкл 15 мМ маточного раствора TAMRA-SE в DMSO и перемешивают. Через 30 мин при комнатной температуре в темноте конечный продукт Fab-TAMRA-QSY7 очищают и собирают с

25 использованием обессоливающей колонки Zeba Spin посредством центрифугирования при 1000 RCF в течение 2 мин. Снова проводят количественное определение концентрации и DOL, считывая оптическую плотность при 280 нм, 555 нм и 560 нм на спектрофотометре NanoDrop. Используя этот протокол, получают приблизительно 300 мкл Fab-TAMRA-QSY7 при

30 концентрации примерно 1,5 мг/мл с приблизительно двумя QSY7 и двумя TAMRA на F(ab')<sub>2</sub>.

#### *Стандартизированное исследование интернализации, проведенное цитометрией посредством сортировки с активацией флуоресценции (FACS)*

Отдельные тестируемые молекулы нормализуют до 1 мг/мл с помощью PBS, а затем дополнительно разбавляют до 8 мкг/мл в полной среде RPMI. Fab-TAMRA-QSY7 разбавляют до

35 5,33 мкг/мл в полной среде RPMI. Антитело и Fab-TAMRA-QSY7 смешивают в равных объемах и инкубируют в течение 30 мин при 4 °С в темноте для образования комплекса. MDDC ресуспендируют в концентрации 4 миллиона/мл в полной среде RPMI и высевают по 50 мкл на

лунку в 96-луночный планшет с круглым дном, после чего в каждую лунку добавляют 50 мкл комплекса антитело/зонд. Клетки инкубируют в течение 24 ч при 37 °С в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Клетки промывают 2% FBS PBS и ресуспендируют в 100 мкл 2% FBS PBS с красителем Cytox Green live/dead. Данные собирают посредством BD LSR Fortessa X-20 и анализируют в FlowJo.

5 Живые одиночные клетки гейтируют, и в качестве показаний записывают процент положительных по TAMRA-флуоресценции клеток.

#### *Представление данных и статистический анализ*

Молекулы тестируют на трех или более донорах в двух или трех повторностях. Для каждого  
10 донора учитывается процент TAMRA-положительной популяции. Чтобы обеспечить сравнение данных по молекулам, полученным при тестировании с разными донорами, применяется нормализованный индекс интернализации (НИ). Сигнал интернализации нормализуется по изотипу IgG1 (НИ = 0) и внутреннему положительному контролю PC (НИ = 100) по формуле:

$$100 \times \frac{X_{TAMRA} - (изотип\ IgG1)_{TAMRA}}{PC_{TAMRA} - (изотип\ IgG1)_{TAMRA}}$$

15 где X<sub>TAMRA</sub>, (изотип IgG1)<sub>TAMRA</sub> и PC<sub>TAMRA</sub> представляют собой процент TAMRA-положительной популяции для тестируемой молекулы X, изотипа IgG1 и PC соответственно. Данные анализируют в JMP® 14.1.0 или Graphpad Prism 8.1.2. Рассчитывают и отмечают среднее значение процента TAMRA-положительной популяции и НИ. Повышенная интернализация в антигенпредставляющих клетках, таких как DC, связана с повышенным риском иммуногенности.

20 Результаты в таблице 9 демонстрируют сниженную интернализацию в DC антитела 1 относительно LY3016859 и, следовательно, сниженный риск иммуногенности.

**Таблица 9. Результаты интернализации в DC**

Тестовое антитело	% TAMRA+	НИ
LY3016859	10,3	16,9
Антитело 1	2,3	1,3

(См., например, Wen, Y., Cahya, S., Zeng, W. *et al.* Development of a FRET-Based Assay for Analysis  
25 of mAbs Internalization and Processing by Dendritic Cells in Preclinical Immunogenicity Risk Assessment. *AAPS J* 22, 68 (2020))

#### Методы MAPP-анализа (МНС-ассоциированная протеомика пептидов)

Первичные дендритные клетки человека от 10 нормальных доноров-людей получали из  
30 лейкоцитарных пленок посредством выделения клеток CD14+ и дифференцировали в незрелые дендритные клетки посредством инкубации с 20 нг/мл IL-4 и 40 нг/мл GM-CSF в полной среде RPMI, содержащей 5% заменителя сыворотки (Thermo Fisher Scientific, № по кат. A2596101) в течение 3 дней при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>, как описано (Knierman et al., "The Human Leukocyte Antigen



Class II Immunopeptidome of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein", *Cell Reports*, 33, 108454 (2020)).

Три микромоля тестового антитела добавляли к приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток на 4-й день и после 5-часовой инкубации заменяли свежую среду, содержащую 5 мкг/мл ЛПС и предназначенную для трансформации клеток в зрелые дендритные клетки. На следующий день созревшие клетки лизировали в 1 мл буфера RIPA с ингибиторами протеаз и ДНКазой. Лизаты хранят при -80 °С до проведения анализа образцов.

Для выделения молекул HLA-II из размороженного лизата с использованием биотинилированных анти-pan HLA антител класса II (клон Tu39) использовали автоматизированную систему обработки жидкостей. Связанный комплекс рецептор-пептид элюировали 5% уксусной кислотой, 0,1% ТФУ. Элюированные пептиды МНС-II пропускают через предварительно промытый фильтр MWCO 10k для удаления белков с высокой молекулярной массой. Выделенные пептиды МНС-II анализировали с помощью нано-ЖХ/МС с использованием системы Thermo easy 1200 nLC-HPLC с масс-спектрометром Thermo LUMOS. Для разделения использовали колонку YMC-ODS C18 размером 75 мкм x 7 см для 65-минутного градиента со скоростью потока 250 нл/мин и 0,1% муравьиной кислоты в воде в качестве растворителя А и 80% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты в качестве растворителя В. Масс-спектрометрию осуществляли в режиме полного сканирования с разрешением 240 000, за которым следовал 3-секундный цикл МС/МС, зависящий от данных, состоящий из быстрых сканирований с ионной ловушкой с фрагментацией HCD и EThcD.

Идентификации пептидов генерируются внутренним конвейером для проведения протеомного анализа (Higgs et al., "Label-free LC-MS method for the identification of biomarkers", *Methods in Molecular Biology*, 428, 209–230 (2008)) с использованием множества алгоритмов поиска без параметра ферментативного поиска по базе данных по крупному рогатому скоту / людям, содержащей тестовые последовательности антител. Рабочий процесс KNIME использовали для обработки идентификационных файлов для образцов. Пептиды, идентифицированные в тестовых образцах, выравнивали по исходной последовательности. Для всех доноров создавали сводные данные, в которых указывали процент доноров, у которых обнаруживаются остатки не зародышевой линии, количество различных областей, в которых проявляются пептиды с остатками не зародышевой линии, и глубина отображения пептидов в каждой области с остатками не зародышевой линии. Увеличение степени обнаружения пептидов не зародышевой линии связано с повышенным риском иммуногенности. Результаты в таблице 8 показывают сниженную степень обнаружения пептидов не зародышевой линии для антитела 1 по сравнению с LY3016859 и, следовательно, сниженный риск иммуногенности антитела 1.

**Таблица 8. Результаты МАРР-анализов**

Тестовое антитело	% Доноров	Количество кластеров	Общее количество не зародышевых остатков из всех кластеров	Общее количество пептидов не зародышевой линии из всех кластеров
LY3016859	60%	3	15	20
Антитело 1	20%	2	5	5

**Пример 6. Демонстрация связывания мембранного эпирегулина in vivo после дозирования крысам**

5 Эпирегулин существует как в мембраносвязанной форме, так и в растворимой форме, которая получается при расщеплении мембранной формы протеазами ADAM (А-дезинтегрин и металлопротеаза). Способность антител по настоящему изобретению связываться с мембранной формой эпирегулина in vivo после периферического дозирования, например, посредством подкожной инъекции, можно оценить путем выделения ткани ex vivo с последующей адаптацией стандартных методов иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано в настоящем документе и/или как известно специалисту в данной области техники. Положительное и специфическое иммунофлуоресцентное мечение эпителиального слоя языка крысы можно продемонстрировать с помощью антитела 1.

15 Крысиный язык можно получить от усыпленных самцов крыс линии Спрег — Дуули (весом 140–215 граммов) после введения различных доз (от 0,1 до 100 мг/кг, подкожно) тестируемых антител, включая антитело 1, или контроль, или антитела сравнения, и в разное время после дозирования (3–28 дней после дозирования), после чего быстро заморозить на сухом льду. Замороженные корональные срезы ткани языка толщиной 20 мкм подвергают оттаиванию, промывают в PBS в течение 3 минут и фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 10 минут.

20 Предметные стекла промывают в растворе Super Sensitive Wash Buffer (HK583-5K, Biogenex), а затем блокируют Power (HK065-5K, Biogenex) плюс 0,1% Triton x-100 в течение 10 минут. После этого предметные стекла промывают и инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре с козьим античеловеческим IgG, конъюгированным с Alexa Fluor 488 (A11013, Life Technologies, 13,3 мкг/мл), и меченым химерным человеческим/мышинным IgG1, называемым в

25 настоящем документе «химерным антителом 1 VR» (SEQ ID 64 и 65), имеющим переменные области (SEQ ID 3 и 4) антитела 1 и мышинные константные области (маркированные DyLight 650). Предметные стекла промывают 3 раза и перед установкой покровных стекол наносят Prolong gold — реагент, препятствующий выгоранию флуоресценции. Флуоресцентные изображения при длине волны 488 и 650 нм образцов по каждому животному получены с использованием микроскопа

30 Keyence BZ800 с одинаковыми настройками экспозиции для всех изображений. Зеленый или красный сигнал внутри положительного по окрашиванию эпителиального слоя количественно оценивают с использованием программного обеспечения ImageJ-Win64 для определения средней

интенсивности путем выбора четырех случайных интересующих областей. Зеленый сигнал появляется из-за наличия связанного антитела 1, или контрольного антитела, или референсного антитела сравнения (введенных *in vivo*), а красный сигнал представляет собой индикацию несвязанного эпирегулина, где детекторное антитело конкурирует со связанным лекарственным  
5 средством и окрашивает только свободный, но не связанный эпирегулин. Полученные данные нормализуют, используя соотношение сигнала (зеленого) индикации конъюгированного с Alexa Fluor 488 козьего античеловеческого IgG и сигнала (красного) индикации оставшегося химерного антитела 1 VR.

На Фиг. 2 показано, что через 3 дня после дозирования антитела 1 в дозах  $\geq 1$  мг/кг  
10 наблюдается значительное дозозависимое увеличение связывания мембранного эпирегулина *in vivo*. На Фиг. 3 показано, что после однократного введения антитела 1 в дозе 10 мг/кг происходит устойчивое связывание мембранного эпирегулина *in vivo* в течение по меньшей мере 14 дней. На Фиг. 4 показана более высокая степень связывания мембранного эпирегулина *in vivo* с антителом 1 по сравнению с более чем в 50 раз менее эффективным связывающим эпирегулин  
15 антителом сравнения. На Фиг. 4 показано, что улучшения аффинности антитела 1 также приводят к улучшенному связыванию мембраносвязанного лиганда эпирегулина *in vivo*.

#### **Пример 7. Картирование эпитопов антитела 1**

20 Антитело 1 представляет собой человеческое антитело IgG4, которое селективно связывает и нейтрализует эпирегулин (EREG), являющийся членом семейства лигандов EGFR, с высокой аффинностью, а также с селективностью по отношению к другим членам семейства лигандов EGFR, причем антитело обладает преимущественной активностью по нейтрализации эпирегулина и фармакокинетическими свойствами. Эти свойства наряду с дополнительными свойствами  
25 стабильности, вязкости и растворимости, описанными в настоящем документе, позволяют получать антитело с комбинацией улучшенных свойств и преимущественный терапевтический агент для нейтрализации активности EREG. Были проведены исследования по картированию эпитопов для определения конкретных аминокислот в человеческом EREG, необходимых для обеспечения связывания и специфичности антитела 1. Критически важные аминокислоты  
30 идентифицировали по кристаллической структуре комплекса «Fab антитела 1 / EREG», причем вклад этих аминокислот дополнительно характеризовали посредством исследований мутагенеза и связывания. Вклады этих аминокислот обеспечивают структурную основу специфичности антитела 1 к EREG по сравнению с другими членами семейства лигандов EGFR. Эти результаты также дают информацию по перекрестной реактивности и селективности у релевантных  
35 доклинических видов.

Последовательности тестовых материалов представлены в перечне аминокислотных и нуклеотидных последовательностей и имеют следующие соотношения: человеческий EREG (SEQ ID NO: 21), HC Fab антитела 1 (SEQ ID NO: 62), LC Fab антитела 1 (SEQ ID NO: 63),

мономерный Fc человеческого EREG (SEQ ID NO: 27), мономерный Fc человеческого EREG E95H (SEQ ID NO: 57), мономерный Fc человеческого EREG E95A (SEQ ID NO: 56), мономерный Fc человеческого EREG H78N (SEQ ID NO: 55), мономерный Fc человеческого EREG H78A (SEQ ID NO: 54), мономерный Fc человеческого EREG F106K (SEQ ID NO: 61), мономерный Fc человеческого EREG F106A (SEQ ID NO: 60), мономерный Fc человеческого EREG Y98A (SEQ ID NO: 58), мономерный Fc человеческого EREG L77F (SEQ ID NO: 53), мономерный Fc человеческого EREG R102A (SEQ ID NO: 59).

Fab-фрагмент антитела 1 и человеческий EREG получали при транзientной экспрессии клеток CHO и очищали стандартными методиками. Комплекс готовили посредством добавления 30% молярного избытка EREG к Fab антитела 1, затем очищали посредством эксклюзионной хроматографии для удаления избытка свободного EREG. Связывание Fab антитела 1 с EREG впервые исследовали посредством анализа методом вестерн-блоттинга, который показал, что Fab антитела 1 в этом анализе может распознавать денатурированный невосстановленный, но не денатурированный восстановленный EREG. Это убедительно свидетельствует о том, что конформационный эпитоп зависит от дисульфидных связей EREG.

### **Кристаллическая структура Fab-фрагмента антитела 1, связанного с человеческим эфирегулином**

Была расшифрована кристаллическая структура Fab-фрагмента антитела 1, связанного с человеческим эфирегулином. Комплекс кристаллизовали, после чего структуру 1,8 Å расшифровывали посредством молекулярного замещения с помощью программного обеспечения Phaser 2.8.3 и далее уточняли с помощью Refmac 5.8.0258. В кристаллической структуре связывание Fab антитела 1 осуществляется на противоположных гранях димера, в который входит эфирегулин. Боковые цепи эфирегулина Leu77 и His78 находятся в центре эпитопа, причем Leu77 скрыта в гидрофобном кармане, а боковая цепь His78 расположена в сетевой структуре водородных связей. Боковая цепь Arg50 тяжелой цепи антитела 1 является донором водородной связи для гидроксильной боковой цепи Tyr52 тяжелой цепи, гидроксил боковой цепи Tyr52 тяжелой цепи является донором водородной связи для акцептора водородной связи депротонированной по N<sup>δ1</sup> боковой цепи His78, протонированная по N<sup>ε2</sup> боковая цепь His78 является донором водородной связи для молекулы воды, а эта молекула воды является донором водорода для карбонильной основной цепи Leu109 тяжелой цепи и основной цепи Tyr107 легкой цепи. Остатки антитела 1 пронумерованы согласно системе обозначений IMGT. Дополнительные идентифицированные контакты эпитопа включают в себя боковые цепи Glu95, Tyr98, Arg102 и Phe106, а также основные цепи Leu77, Val96 и Glu104. Структура четко демонстрирует, что эпитоп антитела 1 является конформационным, а не линейным, что подтверждают приведенные выше результаты вестерн-блоттинга.

## ELISA по мутантному эпирегулину с Fab антитела 1

Ключевые остатки эпитопа дополнительно характеризовали точечным мутагенезом, чтобы понять их относительный вклад как в связывание, так и в селективность. Слитные структуры «мономерный Fc-EREG» (см. выше) разводили до 1 мкг/мл в PBS, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл для покрытия планшета при проведении ELISA (Greiner, № по кат. 655061) и выдерживали в течение ночи при 5 °С. Варианты группировали на планшете по колонкам, при этом покрытие с диким типом было в колонках с 3 повторностями, а точечные мутации — в колонках с одной повторностью. После нанесения покрытия планшет промывали 3 раза 200 мкл PBST на лунку, затем блокировали при комнатной температуре в течение 1 часа на планшетном шейкере с использованием блокирующего казеин буфера (Thermo, № по кат. 37528). После блокировки планшет промывали так же, как и ранее. Fab-фрагмент антитела 1 разводили до 1 мкг/мл в блокирующем казеин буфере, затем проводили последовательное 3-кратное разведение в блокирующем буфере с получением в совокупности 7 концентраций и холостого блокирующего буфера. Последовательные разведения Fab добавляли на подготовленный планшет для ELISA по 100 мкл на лунку и инкубировали при комн. темп. в течение 1 часа на планшетном шейкере. Планшет промывали так же, как и ранее, а затем в каждую лунку добавляли 100 мкл конъюгированного с HRP вторичного козьего антитела против легкой цепи каппа человека (Southern Biotech, № по кат. 2060-05), разведенного в соотношении 1 : 8000 в блокирующем буфере. Планшет инкубировали со вторичными антителами в течение 1 часа при комн. темп. на планшетном шейкере, а затем промывали так же, как и ранее. Подготавливали субстрат TMB (Thermo, № по кат. 34021) и добавляли во все лунки по 100 мкл. Планшет инкубировали в статическом режиме при комн. темп. в течение 3–5 минут, затем во все лунки добавляли по 100 мкл 1 н. HCl для остановки реакции. Считывание планшета осуществляли на считывающем устройстве для планшетов на 450 нм. Холостые вычитенные данные ELISA наносили на график в GraphPad Prism 9 с концентрацией антител по оси X и OD450 по оси Y. Кривые получали посредством аппроксимации данных с использованием нелинейной регрессии к модели «Сигмоидальная, 4PL, X — концентрация».

Точечные мутации оценивали посредством ELISA с нанесением на лунки планшета покрытия из мутантного эпирегулина с добавлением последовательно разведенных Fab антитела 1 и измерением сигнала с помощью вторичного антитела против цепи каппа (см. **Фиг. 5**). За исключением Y98A, все мутантные варианты демонстрировали пониженное связывание. Мутация H78A практически подавила связывание, а вариант с мутацией Y98A не продемонстрировал обнаруживаемого связывания в протестированных концентрациях.

## 35 SPR-анализ связывания Fab-фрагмента антитела 1 с мутантами «мономерный Fc-человеческий EREG»

Для SPR-анализа связывания Fab-фрагмента антитела 1 с обоими мутантами «мономерный Fc-человеческий EREG» применяли прибор и реагенты Biacore 8K (Cytiva). Мутанты «мономерный Fc-человеческий EREG» в низких концентрациях иммобилизовали в проточных кюветах для образцов (Fc2) с сенсорным чипом серии CM5 S (Cytiva, № по каталогу BR100530) с использованием набора для связывания по аминокгруппе (Cytiva, № по каталогу BR100050), а также метода Low Level CM5 Coupling с управляющим программным обеспечением для прибора Biacore 8K. Рабочий буфер представлял собой 1X HBS-EP+, pH 7,4 (получен из 20X HBS-EP+, Teknova, № по каталогу H8022) или 1X MBS-EP+, pH 6,0 (10 mM MES + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + 0,05% Tween 20), а рабочая температура составляла 37 °C. Эксперименты с использованием Biacore проводили в виде трех независимых экспериментов с однократными повторностями для каждого разведения в каждом независимом эксперименте. Данные SPR с вычитанием референсных значений и вычитанием данных по холостому образцу анализировали с использованием либо кинетической модели «связывание 1 : 1» (с вариантами EREG), либо модели «равновесная аффинность» с использованием Biacore Insight Evaluation версии 3.0 (Cytiva) для определения значения  $K_D$ .

Fab антитела 1 разводили в рабочем буфере до 300 нМ (pH 7,4) или 900 нМ (pH 6,0), затем подвергали последовательному 3-кратному разведению, при этом всего было 7 разведений. Fab вводили во все проточные кюветы в течение 240 секунд с последующей диссоциацией в течение 1800 секунд при расходе 50 мкл/мин. Поверхность чипа регенерировали 2 x 30-секундными инъекциями 7 М гуанидина при 100 мкл/мин. Вычитенные значения референсных данных собирали как сигналы по проточной кювете для образцов минус сигналы по референсной проточной кювете (Fc2 - Fc1) в каждом из 8 каналов, а затем из референсных вычитенных данных вычитали сигнал холостого буфера.

Аффинность связывания подмножества мутантов измеряли с помощью системы Biacore при 37 °C. Результаты представлены в таблице 9 как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по 3 независимым повторным измерениям. «отн.» обозначает «относительно дикого типа (wt)».

**Таблица 9. Аффинность связывания антитела 1 с диким типом и мутантным EREG при pH 6,0 и pH 7,4 при 37 °C**

Вариант EREG	SEQ ID NO	pH 7,4, 37 °C K <sub>D</sub> (пМ)	pH 7,4 K <sub>D</sub> Кратность изменения (отн. wt)	pH 6,0, 37 °C K <sub>D</sub> (пМ)	pH 6,0 K <sub>D</sub> Кратность изменения (отн. wt)	K <sub>D</sub> при pH 6,0 / K <sub>D</sub> при pH 7,4
wt (дикий тип)	27	51,8 ± 5,6	1	508 ± 6	1	9,8
L77F	53	26 500 ± 1600	511	197 000 ± 6000	388	7,4
H78N	55	29 300 ± 1500	565	25 600 ± 2200	50	0,9
E95A	56	19 600 ± 1700	379	81 400 ± 500	160	4,2
E95H	57	7180 ± 420	139	47 300 ± 700	93	6,6
R102A	59	177 ± 43	3	1930 ± 140	4	10,9
F106A	60	12 500 ± 500	241	77 100 ± 3600	152	6,2
F106K	61	54 600 ± 3100	1050	293 000 ± 16 000	577	5,4

Результаты в таблице 9 показывают диапазон более слабых аффинностей к мутантам: от 3-кратного для R102A до > 1000-кратного для F106K при pH 7,4.

## 5 Выравнивание эпитопов лигандов человеческого EGFR

В контексте выравнивания последовательностей лигандов EGFR (Фиг. 6) данные показывают, что E95 и F106 являются ключевыми эпитопными положениями, обеспечивающими EREG-селективность. 100% консервативные положения Y98 и R102, хоть они и важны для связывания, не способствуют селективности. L77 и H78 также имеют критическое значение для связывания и влияют на селективность, но они высококонсервативны среди лигандов EGFR и, следовательно, не являются специфичными для EREG. Эти результаты демонстрируют не только структурную основу связывания и исключительную селективность антитела 1 к EREG, но и дают информацию о селективности лигандов и их видов на основе исследований по картированию эпитопов.

**Перечень аминокислотных и нуклеотидных последовательностей**

**Тяжелая цепь антитела 1 (SEQ ID NO: 1)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYPSGNTNYNPSLKSR  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGLVMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCS  
5 RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT  
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
10 TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

**Легкая цепь антитела 1 (SEQ ID NO: 2)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVEFSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS  
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGTNPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
15 VVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTLTLKADYEKHKVYAC  
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**HCVR антитела 1 (SEQ ID NO: 3)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYPSGNTNYNPSLKSR  
20 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGLVMDVWGQGTLLTVSS

**LCVR антитела 1 (SEQ ID NO: 4)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVEFSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS  
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGTNPFTFGQGTKVEIK

25 **HCDR1 антитела 1 (SEQ ID NO: 5)**

TVSGGSISSYYWS

**HCDR2 антитела 1 (SEQ ID NO: 6)**

RIYPSGNTN

30

**HCDR3 антитела 1 (SEQ ID NO: 7)**

ARGGLVMDV

**LCDR1 антитела 1 (SEQ ID NO: 8)**

35 RASQSVEFSYLA

**LCDR2 антитела 1 (SEQ ID NO: 9)**

YGASSRAT

40 **LCDR3 антитела 1 (SEQ ID NO: 10)**

HQYGTNPFT

**ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела 1 (SEQ ID NO: 11)**



CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC  
CTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTTCGTACTIONACTGGAGCTGGATTTCGGCAGCCCAG  
GGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGGATCTATCCGAGTGGGAACACCAACTACAACCCCTC  
CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA  
5 GCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGACTGGTGTATGGA  
CGTGTGGGGACAGGGAACACTAGTGACCGTGAGTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTTC  
TTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT  
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC  
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGC  
10 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAG  
CACCTGAGGCCGCCGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTC  
ATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCG  
AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG  
15 GGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACT  
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGA  
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA  
TCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC  
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA  
20 CGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG  
AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA  
CTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

**ДНК, кодирующая легкую цепь антитела 1 (SEQ ID NO: 12)**

25 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT  
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGTCTGTGGAATTCAGTACTTAGCCTATGGTGCATCCAGCAGGG  
CCTTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGC  
AGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC  
CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTCACCAGTACGGAACAAACC  
30 CGTTCACATTCGGGCAGGGAACCAAGGTTGAAATAAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG  
GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC  
35 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

**Человеческий эфирегулин (SEQ ID NO: 21)**

VSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL

40 **Конструкт человеческого эфирегулина (SEQ ID NO: 22)**

GPGVVSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

**Эфирегулин яванского макака (SEQ ID NO: 23)**

VSITKNSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFYL

45

**Крысиный эфирегулин (SEQ ID NO: 24)**

VLITKCSSDMMDGYCLHGHCYLVDMSEKYCRCEVGYTGLRCEHFFL

**Эпирегулин кролика (SEQ ID NO: 25)**

VSITKCGSDMNGYCLHGQCIYLVDMSENYCRCEVGYTGVRCEHFFL

**Полноразмерный человеческий эпирегулин (связанный с мембраной, с мутацией T111P)**

5 **(SEQ ID NO: 26)**

MTAGRREMLCAGRVPALLLCLGFHLLQAVLSTTVIPSCIPGESSDNCTALVQTEDNPRVAQVSI  
TKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLTVPQPLSKEYVALTVILILFLI  
TVVGSTYYFCRWYRNRKSKEPKKEYERVTSGDPELPQV

10 **Человеческий эпирегулин с мономерной Fc (SEQ ID NO: 27)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
15 LVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

**Отщепленный мышинный EREG (SEQ ID NO: 28)**

GPGVQITKSSDMDGYCLHGQCIYLVDMREKFCRCEVGYTGLRCEHFFLG

20 **Мышиный TGF $\alpha$ -His (SEQ ID NO: 29)**

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCTRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCSEHADLLAGHNNHHHH

**HCDR1 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 31)**

SYYS

25

**HCDR2 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 32)**

RIYPSGNTNYPNPSLKS

**HCDR3 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 33)**

30

GGLVMDV

**LCDR1 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 34)**

RASQSVESYLA

35 **LCDR2 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 35)**

GASSRAT

**LCDR3 антитела 1 (по Кабату) (SEQ ID NO: 36)**

HQYGTNPFT

**HCDR1 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 37)**

GGSISSY

5

**HCDR2 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 38)**

YPSGN

**HCDR3 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 39)**

10

GGLVMDV

**LCDR1 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 40)**

RASQSVEFSYLA

15

**LCDR2 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 41)**

GASSRAT

**LCDR3 антитела 1 (по Чотиа) (SEQ ID NO: 42)**

HQYGTNPFT

20

**HCDR1 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 43)**

GGSISSYY

**HCDR2 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 44)**

25

IYPSGNT

**HCDR3 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 45)**

ARGGLVMDV

30

**LCDR1 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 46)**

QSVEFSY

**LCDR2 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 47)**

GAS

35

**LCDR3 антитела 1 (IMGT) (SEQ ID NO: 48)**

HQYGTNPFT

**Шарнирная область IgG4PAA (SEQ ID NO: 51)**

ESKYGPPCPPCP

**Область Fc IgG4PAA (SEQ ID NO: 52)**

5 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

10 **Мономерный Fc huEREG с L77F (SEQ ID NO: 53)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCFHGQCIY  
15 LVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с H78A (SEQ ID NO: 54)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
20 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLAGQCIY  
LVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с H78N (SEQ ID NO: 55)**

25 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLNGQCIY  
LVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFLG

30

**Мономерный Fc huEREG с E95A (SEQ ID NO: 56)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
35 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
LVDMSQNYCRCAVGYTGVRCEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с E95H (SEQ ID NO: 57)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
5 LVDM SQNYCRCHVGYTGVRCEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с Y98A (SEQ ID NO: 58)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
10 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
LVDM SQNYCRCEVGATGVRCEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с R102A (SEQ ID NO: 59)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
15 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
LVDM SQNYCRCEVGYTG VACEHFFLG

**Мономерный Fc huEREG с F106A (SEQ ID NO: 60)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
25 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
LVDM SQNYCRCEVGYTGVRCEHAFLG

**Мономерный Fc huEREG с F106K (SEQ ID NO: 61)**

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
30 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLEVLFGQPGVSITKCSSDMNGYCLHGQCIY  
LVDM SQNYCRCEVGYTGVRCEHAKLG

**35 HC Fab антитела 1 (SEQ ID NO: 62)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYPSGNTNYPNPSLKSR  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGLVMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCS

RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT  
YTCNVDPKPSNTKVDKRVESK

**LC Fab антитела 1 (SEQ ID NO: 63)**

5 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEFSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS  
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGTNPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC  
EVTQGTTSVTKSFNRGEC

10 **HC химеры человеческий/мышинный IgG1, антитело 1 VR (SEQ ID NO: 64)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYPSGNTNYPNPSLKS  
VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGLVMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPGS  
AAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETV  
TCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDD  
15 PEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT  
ISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDT  
DGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

**LC химеры человеческий/мышинный иммуноглобулин каппа, антитело 1 VR (SEQ ID NO: 65)**

20 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEFSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS  
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGTNPFTFGQGTKVEIKRTVAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV  
VCFLNNTFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC  
THKTSTSPIVKSFNRNEC

25 **человеческий эпиген/EPGN (SEQ ID NO: 66)**

KFSLHCLDHNYSYINGACAFHHELEKAICRCFTGYTGERCEHLTLT

**человеческий амфирегулин/AREG (SEQ ID NO: 67)**

KKKNPCNAEFQNFCSIHGCECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKSMK

30

**человеческий гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста / HBEGF  
(SEQ ID NO: 68)**

KKRDPCLRKYKDFCIHGCECKYVVELRAPSCICHPGYHGERCHGLSL

35 **человеческий бетацеллюлин/BTC (SEQ ID NO: 69)**

GHFSRCPKQYKHYCIKGRCRFVVAEQTPSCVCEGYIGARCERVDLFY

**человеческий трансформирующий фактор роста альфа / TGFa (SEQ ID NO: 70)**

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

**человеческий эпидермальный фактор роста / EGF (SEQ ID NO: 71)**

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает человеческий эпирегулин, причем антитело содержит  
5 варьируемую область тяжелой цепи (VH) и варьируемую область легкой цепи (VL), при этом VH  
содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и  
HCDR3, а VL содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1,  
LCDR2 и LCDR3, причем
- HCDR1 содержит SEQ ID NO: 5,
  - HCDR2 содержит SEQ ID NO: 6,
  - 10 HCDR3 содержит SEQ ID NO: 7,
  - LCDR1 содержит SEQ ID NO: 8,
  - LCDR2 содержит SEQ ID NO: 9 и
  - LCDR3 содержит SEQ ID NO: 10.
- 15 2. Антитело по п. 1, в котором VH содержит SEQ ID NO: 3, а VL содержит SEQ ID NO: 4.
3. Антитело по п. 1 или 2, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 1, и легкую  
цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 2.
- 20 4. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность SEQ ID NO: 11 или 12.
5. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 4.
6. Вектор по п. 5, содержащий последовательность первой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11 и  
25 последовательность второй нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12.
7. Композиция, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой  
кислоты SEQ ID NO: 11, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты  
SEQ ID NO: 12.
- 30 8. Клетка, содержащая вектор по п. 5 или 6.
9. Клетка, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты  
SEQ ID NO: 11, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты  
35 SEQ ID NO: 12.
10. Клетка по п. 8 или 9, представляющая собой клетку млекопитающего.



11. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки по любому из пп. 8–10 в таких условиях, что осуществляется экспрессия антитела, и выделение экспрессируемого антитела из культуральной среды.
- 5
12. Антитело, полученное способом по п. 11.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–3 или 12 и фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.
- 10
14. Способ лечения болевого расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–3 или 12 или фармацевтической композиции по п. 13.
- 15
15. Способ по п. 14, в котором болевое расстройство выбрано из группы, состоящей из боли при остеоартрите, диабетической периферической нейропатической боли и хронической боли в пояснице.
16. Способ по п. 15, в котором болевое расстройство представляет собой боль при остеоартрите.
- 20
17. Способ по п. 15, в котором болевое расстройство представляет собой диабетическую периферическую нейропатическую боль.
18. Способ по п. 15, в котором болевое расстройство представляет собой хроническую боль в пояснице.
- 25
19. Способ по п. 15, в котором болевое расстройство устойчиво к терапии.
20. Антитело по любому из пп. 1–3 или 12 для применения в терапии.
- 30
21. Антитело по любому из пп. 1–3 или 12 или фармацевтическая композиция по п. 13 для применения при лечении болевого расстройства.
22. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 21, причем болевое расстройство выбрано из группы, состоящей из боли при остеоартрите, диабетической периферической нейропатической боли и хронической боли в пояснице.
- 35

23. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 21, причем болевое расстройство представляет собой боль при остеоартрите.

24. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 21, причем болевое расстройство представляет собой диабетическую периферическую нейропатическую боль.

5

25. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 21, причем болевое расстройство представляет собой хроническую боль в пояснице.

26. Применение антитела по любому из пп. 1–3 или 12 в производстве лекарственного препарата для лечения болевого расстройства.

10

27. Применение по п. 26, причем болевое расстройство выбрано из группы, состоящей из боли при остеоартрите, диабетической периферической нейропатической боли и хронической боли в пояснице.

15

28. Способ определения уровня человеческого эпирегулина в образце биологической жидкости, включающий:

(a) приведение образца биологической жидкости в контакт с диагностическим моноклональным антителом против человеческого эпирегулина или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1–3;

20

(b) необязательно удаление любого неспецифически связанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

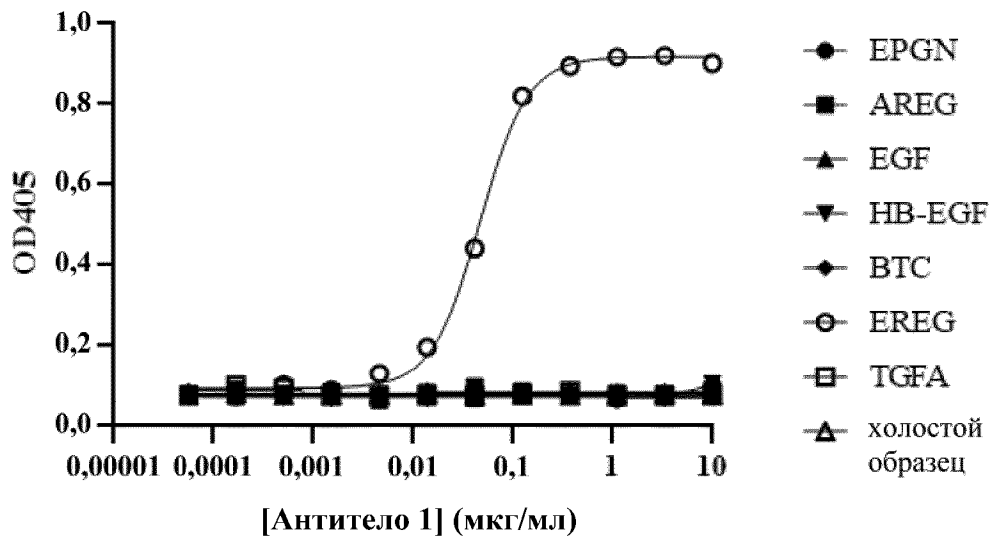
(c) обнаружение и/или количественная оценка количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связан с человеческим эпирегулином.

25

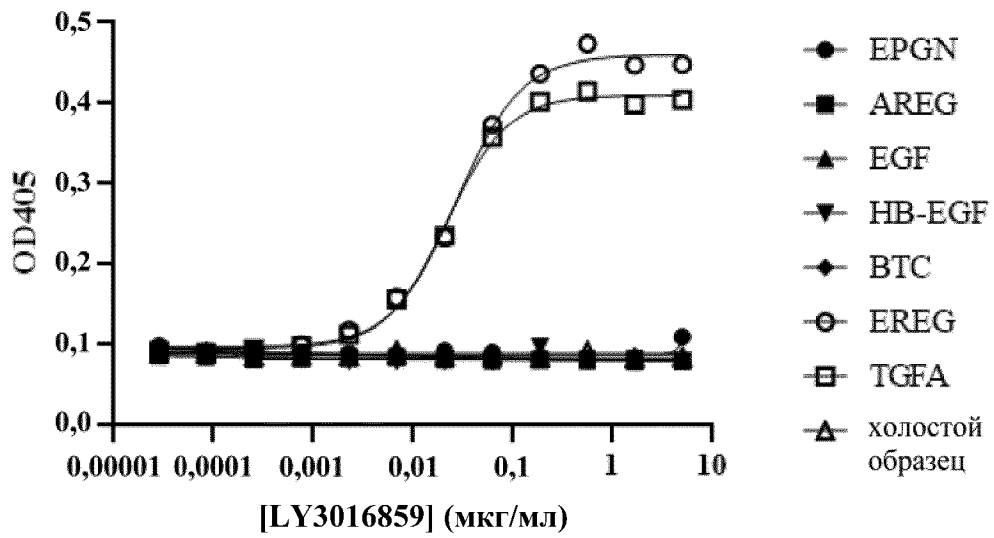
29. Способ по п. 28, в котором упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки или плазмы или образец спинномозговой жидкости, а упомянутое приведение в контакт осуществляется *ex vivo*.

30

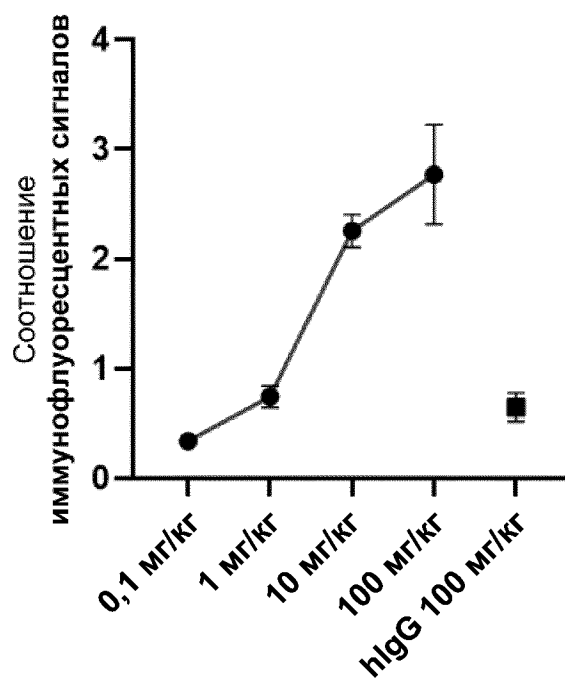
A



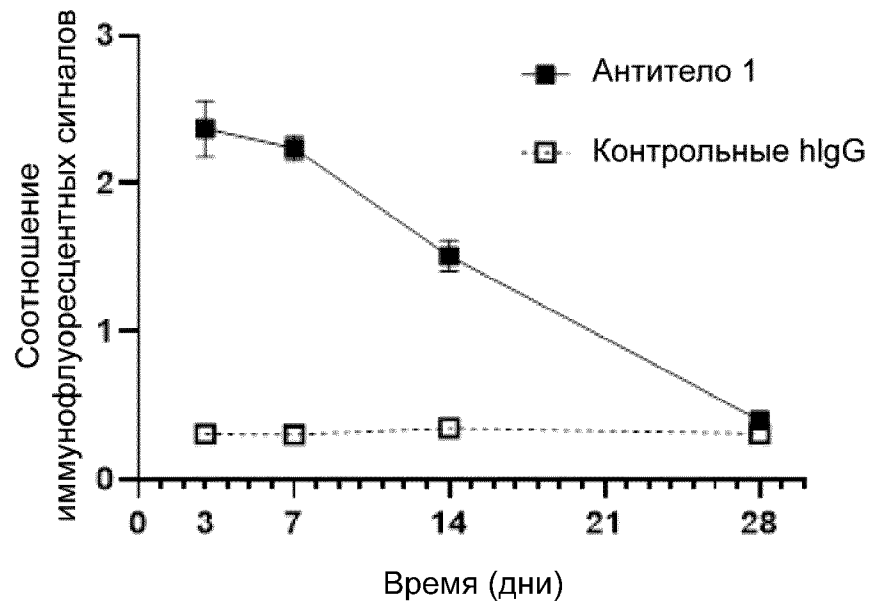
B



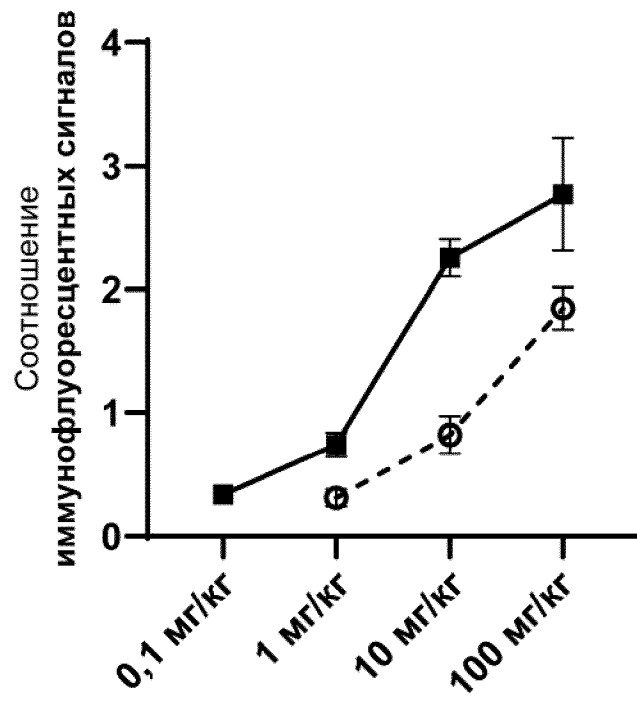
ФИГ. 1



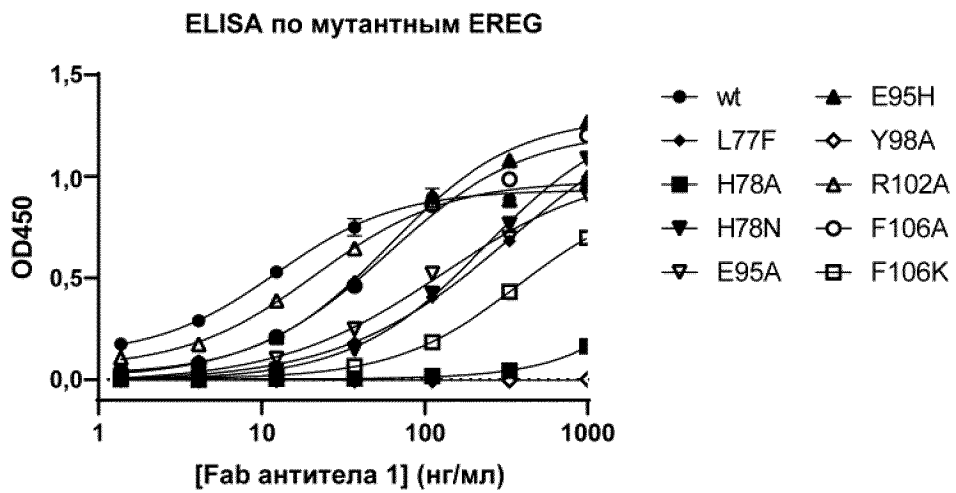
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5

	L77/H78										E95 Y98 R102 F106																	
EREG	--VSITKCSSDMNGY	<b>L</b>	<b>H</b>	-GQCIY	<b>L</b>	VDMSQNYCRQEV	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	--												
EPGN	--KFSHLCL	EDHNSY	<b>G</b>	<b>I</b>	N-GACAFHHELEKAI	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>O</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>T</b>							
AREG	--KKKNPCNAEFQNE	<b>G</b>	<b>I</b>	H-GECKYIEHLEAVT	<b>C</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>-</b>							
HBEGF	--KKRDPCLRK	<b>K</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	H-GECKYVKELRAP	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>-</b>				
BTC	--GHFSRCPKQYKHY	<b>C</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	-GRCRFVVAEQTP	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>					
TGFA	VVSHFNDCPDSHTQ	<b>F</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	-GTCRFLVQEDKPA	<b>C</b>	<b>V</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>A</b>					
EGF	--NSDSECPLSHDGY	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	DGVCMYIEALDKY	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>W</b>						
Консенсус		C	H	Y	C	I	H	G	C	K	Y	I	L	D	A	C	N	V	V	G	I	G	E	R	C	E	H	L

ФИГ. 6