

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490537** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.04.19

(22) Дата подачи заявки
2022.08.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/32** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К HER2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/237,104**

(32) **2021.08.25**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/075438**

(87) **WO 2023/028543 2023.03.02**

(88) **2023.06.08**

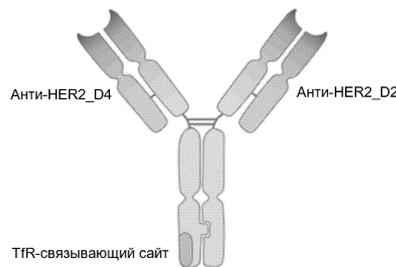
(71) Заявитель:
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Бандиопадхай Абира, Клеменс
Аллиса Джейн, Ким То Чин, Пиццо
Мишель Э., Шань Лу, Теолис, м.л.,
Ричард, Тун Реймонд Ка Хан (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В одном аспекте предложены антитела, которые связываются с субдоменом II HER2 человека. В еще одном аспекте предложены антитела, содержащие полипептид легкой цепи, который соединяется как с полипептидом тяжелой цепи для связывания с субдоменом II HER2 человека, так и с полипептидом тяжелой цепи для связывания с субдоменом IV HER2 человека. В дополнительном аспекте предложены антитела, которые связываются как с субдоменом II, так и с субдоменом IV HER2 человека, содержащими общий полипептид легкой цепи. Также предложены способы лечения злокачественного новообразования или лечения метастазов в головном мозге при злокачественном новообразовании с применением этих антител.



A1

202490537

202490537

A1

АНТИТЕЛА К HER2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/237104, поданной 25 августа 2021 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Уровень техники

Лечение метастазов в головном мозге при злокачественных новообразованиях, таких как рак молочной железы, в настоящее время представляет собой сложную клиническую задачу. Среди пациентов с раком молочной железы частота метастазирования в головной мозг достигает 50%. Клинические данные указывают на склонность HER2-положительного рака молочной железы к метастазированию в головной мозг. Примечательно, что терапевтические средства против HER2 оказались полезными для контроля экстракраниальных опухолей, но не интракраниальных поражений. Неспособность этих терапевтических средств контролировать метастатические поражения, такие как метастазы в головном мозге при HER2-положительном раке молочной железы, в основном объясняется неспособностью терапевтических агентов преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и получать доступ к паренхиме головного мозга.

Сущность изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу, содержащему одну или более (например, одну, две или все три) определяющие комплементарность области (CDR), выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91,

при этом по меньшей мере одно из:

X₁ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₂ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой F;

X₃ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₁ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₂ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₃ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой S;
X₄ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;
X₅ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;
X₆ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой Q;
X₁ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой L;
X₂ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой G;
X₃ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой P; и
X₄ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой S.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, где X₁ представляет собой N, K, M, или H. В некоторых вариантах осуществления CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₆ представляет собой R, H, или T. В некоторых вариантах осуществления CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой W, F, D, L, или Y. В некоторых вариантах осуществления CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;
- (b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q; и
- (c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;
- (b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с

аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более

(например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3.

В связанном аспекте данное изобретение относится к выделенной тяжелой цепи антитела, содержащей одну или более (например, одну, две или все три) CDR, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3. В

некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, содержащему:

(a) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну или более (например, одну или обе) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

и

(c) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну или более (например, одну или обе) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; и

(c) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

В связанном аспекте данное изобретение относится к выделенной легкой цепи антитела, содержащей одну или более (например, одну, две или все три) CDR, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела содержит

вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу, содержащему антигенсвязывающий сайт, содержащий:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17;
и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO:15.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт дополнительно содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий сайт содержит переменную область легкой цепи, включающую последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие сайты содержат одни и те же последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR тяжелой и легкой цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 1.

В связанном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу, содержащему тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу, содержащему:

- (a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2);
- (b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека; и
- (c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TfR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

В связанном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, содержащему:

- (a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека;
- (b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека; и
- (c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TfR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит модифицированный домен CH3, содержащий TfR-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен CH3 происходит из домена CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен CH3 содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или одиннадцать замен в наборе аминокислотных положений, включающем 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413,

415, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен CH3 содержит Glu, Leu, Ser, Val, Trp, Tyr или Gln в положении 380; Leu, Tyr, Phe, Trp, Met, Pro или Val в положении 384; Leu, Thr, His, Pro, Asn, Val или Phe в положении 386; Val, Pro, Ile или кислую аминокислоту в положении 387; Trp в положении 388; алифатическую аминокислоту, Gly, Ser, Thr или Asn в положении 389; Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Glu, Asn, Arg или Thr в положении 390; кислую аминокислоту, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro, Ile или His в положении 413; Glu, Ser, Asp, Gly, Thr, Pro, Gln или Arg в положении 415; Thr, Arg, Asn или кислую аминокислоту в положении 416; и/или ароматическую аминокислоту His или Lys в положении 421 в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc, который содержит модификации, создающие TfR-связывающий сайт, связывается с апикальным доменом TfR.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого полипептида Fc и второго полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В других вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержит модификации, которые снижают TfR-опосредованную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модификации, снижающие эффекторную функцию, представляют собой замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU. В других вариантах осуществления второй полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или ее часть связана с N-концом первого полипептида Fc и/или второго полипептида Fc.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–86 и 98–100. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100. В других вариантах осуществления первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-84, 86 и 98.

В некоторых вариантах осуществления этого антитела первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1–3 и 60–70; первый полипептид Fc, который содержит модификации, создающие TfR-связывающий сайт, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:74–84, 86 и 98; и полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

В других вариантах осуществления этого антитела первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 и 60-70; второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; первый полипептид Fc, который содержит модификации, создающие TfR-связывающий сайт, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-84, 86 и 98; и полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:

71–73, 85 и 99–100.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc, независимо содержащие замену S239D и/или I332E, способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления этого антитела:

- (a) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (b) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (d) второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (f) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (g) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (h) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (i) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (j) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (k) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (l) второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (m) первый полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (n) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(o) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU.

В определенных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(d) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(d) первый полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU, а второй полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две тяжелые цепи и две

легкие цепи. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и Fc, выбранные из комбинаций в таблице 3, а вторая тяжелая цепь содержит V_H и последовательность Fc, выбранную из комбинаций в таблице 4. В определенных вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и Fc, выбранные из комбинаций в таблице 5, а вторая тяжелая цепь содержит последовательность V_H и Fc, выбранную из комбинаций в таблице 6.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из описанных в данном документе антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в данном документе.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид по предыдущему аспекту.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид или вектор.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования или лечения метастазов в головном мозге при злокачественном новообразовании у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления антитело применяют в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой метастатическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительное злокачественное новообразование.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено схематическое изображение, демонстрирующее иллюстративное биспецифическое антитело, имеющее первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека («анти-HER2_D4») и второй антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека («анти-HER2_D2»), в котором первый и второй

антигенсвязывающие сайты включают идентичный полипептид легкой цепи и димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, имеющий TfR-связывающий сайт и мутацию по типу «выступ», и второй полипептид Fc, имеющий мутацию по типу «впадина».

На фиг. 2 показаны результаты анализа ингибирования роста клеток ZR-75-30, а также значения IC50 и максимального % ингибирования роста для различных антител в таблице 12.

На фиг. 3А и 3В показана противоопухолевая активность опухоли *in vivo* в исследовании применения однократной дозы биспецифического антитела ATV:CLC на 2 моделях ксенотрансплантатов, полученных из линии клеток человека. Фиг. 3А: BT-474; фиг. 3В: OE19.

На фиг. 4А и 4В показана противоопухолевая активность опухоли *in vivo* в исследовании применения однократной более низкой дозы биспецифического антитела ATV:CLC на 2 моделях ксенотрансплантатов, полученных из линии клеток человека. Фиг. 4А: BT-474; фиг. 4В: OE19.

На фиг. 5А и 5В показана противоопухолевая активность опухоли *in vivo* в исследовании применения многократных доз биспецифического антитела ATV:CLC на 2 моделях ксенотрансплантатов, полученных из линии клеток человека. Фиг. 5А: BT-474; фиг. 5В: OE19.

На фиг. 6 показано накопление головным мозгом биспецифического антитела ATV:CLC.

На фиг. 7А и 7В показано распределение биспецифических антител CLC в головном мозге при ИГХ.

На фиг. 8 показана ФК в плазме в исследовании применения однократной дозы биспецифических антител ATV:CLC у яванских макаков.

На фиг. 9 показано ADCC биспецифических антител ATV:CLC.

Подробное описание сущности изобретения

I. Введение

В данном документе описаны биспецифические антитела к HER2, в которых используется подход с общей легкой цепью, т.е. два антигенсвязывающих домена, которые соединены с идентичной легкой цепью, но при этом сохраняют отдельные специфичности. Применение общей легкой цепи предотвращает ошибочное спаривание легких цепей и, как следствие, упрощает производство этих биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела содержат первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека и второй

антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека, причем полипептидная последовательность легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична полипептидной последовательности легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте. В еще одном варианте осуществления биспецифические антитела содержат первый антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека и второй антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека, причем полипептидная последовательность легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична полипептидной последовательности легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

Кроме того, ранее полученные терапевтические средства не помогли справиться с метастазами в головном мозге при HER2-положительном раке молочной железы в основном из-за неспособности терапевтических агентов пересечь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и получить доступ к паренхиме мозга. Таким образом, существует потребность в новых терапевтических агентах, которые могут проникать через ГЭБ и воздействовать на HER2 в паренхиме головного мозга. Ранее мы описали использование связывания трансферринового рецептора (TfR) в качестве метода для обеспечения доставки через ГЭБ через эндотелий головного мозга, поскольку TfR высоко экспрессируется в эндотелиальных клетках мозга и может обеспечить доставку через ГЭБ посредством рецептор-опосредованного трансцитоза. Интересно, что TfR высоко экспрессируется при различных злокачественных новообразованиях, включая HER2-положительный рак молочной железы. Механизм, с помощью которого раковые клетки приобретают повышенную экспрессию TfR, вероятно, связан с пролиферацией опухолевых клеток и повышенной метаболической потребностью, такой как поглощение железа. Фактически, общедоступные наборы данных микроматричного анализа продемонстрировали корреляцию экспрессии TfR с прогнозом рака молочной железы (Miller et al., *Cancer Res.* 71:6728, 2011). Также было несколько сообщений об использовании TfR в качестве фармакологической мишени для различных типов злокачественных новообразований.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к HER2 содержит один или более модифицированных полипептидов Fc, которые специфически связываются с рецептором ГЭБ, например, TfR (т.е. TfR-связывающие полипептиды Fc). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к HER2 способно транспортироваться через ГЭБ. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела к HER2, связывающиеся как с HER2, так и с TfR, как описано в данном документе, могут обеспечивать дополнительные противоопухолевые эффекты при связывании с HER2-положительными опухолевыми клетками, которые также

экспрессируют высокие уровни TfR, по сравнению с другими терапевтическими агентами, которые связываются только с HER2. В частности, поскольку эти антитела могут одновременно связываться как с TfR, так и с HER2, это может повысить их активность и/или эффективность.

II. Определения

Употребляемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «антитело» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», когда они используются для изменения количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают, что числовое значение, а также разумные отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники, например $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в пределах предполагаемого значения указанного значения.

Термины «рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа», «HER2», «HER2/neu» и «ERBB2» (также известный как CD340, рецептор тирозин-белковой киназы erbB-2, протонкоген и Neu,) относится к белку тирозинкиназного рецептора, который кодируется геном *ERBB2* человека, являющемуся членом семейства эпидермального рецептора фактора роста человека (HER/EGFR/ERBB). Амплификация или сверхэкспрессия HER2 играет значительную роль в развитии и прогрессировании определенных агрессивных типов злокачественного новообразования, включая рак молочной железы. Неограничивающие примеры нуклеотидных последовательностей HER2 человека изложены в GenBank с номерами NP_001005862, NP_001289936, NP_001289937, NP_001289938 и NP_004448. Неограничивающие примеры аминокислотных последовательностей HER2 человека изложены в GenBank с номерами NP_001005862, NP_001276865, NP_001276866, NP_001276867 и NP_004439.

Домен HER2, который содержит приблизительно 600 аминокислот, содержит четыре субдомена (субдомены I, II, III и IV). Субдомены I и III образуют сайт связывания лиганда. Богатые цистеином субдомены II и IV участвуют в гомодимеризации и гетеродимеризации рецептора. Антитела к HER2 могут связываться со специфическими субдоменами (например, субдоменом II и/или субдоменом IV).

В контексте данного документа термин «анти-HER2_D2» или «анти-HER2_D4» относится к антителу, которое связывается с субдоменом II или IV, соответственно, HER2 человека.

В контексте данного документа термин «антитело» относится к белку с

характерной для иммуноглобулинов укладкой цепей, который специфически связывается с антигеном через свои переменные области. Термин охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, одноцепочечные антитела, полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, моноспецифические антитела, моновалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела. В контексте данного документа термин «антитело» также включает фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую специфичность, включая, помимо прочего, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv и двухвалентный scFv. Антитела могут содержать легкие цепи, которые классифицируются как каппа или лямбда. Антитела могут содержать тяжелые цепи, которые классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

Иллюстративная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины «переменная область легкой цепи» (V_L) и «переменная область тяжелой цепи» (V_H) относятся к этим легкой и тяжелой цепям, соответственно.

Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, полученному из гена вариабельности (V), гена разнообразия (D) или гена присоединения (J) зародышевой линии (и не происходит из генного сегмента константной области (C_μ и C_δ)), и это придает антителу его специфичность в отношении связывания с антигеном. Как правило, переменная область антитела включает четыре консервативные «каркасные» области, перемежающихся с тремя гипервариабельными «определяющими комплементарность областями».

Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к трем гипервариабельным областям в каждой цепи, которые разделяют четыре каркасные области, образованные переменными областями легкой и тяжелой цепей. CDR в первую очередь ответственны за связывание антитела с эпитопом антигена. CDR каждой цепи, как правило, обозначают как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются указанием цепи, в которой находится конкретная CDR. Таким образом, CDR3 V_H или CDR-H3 расположены в переменной области тяжелой цепи антитела, в котором они обнаружены, тогда как CDR1 V_L или CDR-L1 представляют собой CDR1 из переменной области легкой цепи

антитела, в которой он обнаружен.

«Каркасные области» или «FR» различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах вида. Каркасная область антитела, то есть, объединенные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для локализации и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. Каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов переменной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных переменных генов зародышевой линии «VBASE2» для последовательностей человека и мыши.

Аминокислотные последовательности CDR и каркасных областей могут быть определены с использованием различных хорошо известных определений в данной области техники, например, по Kabat, Chothia, международной базы данных ImMunoGeneTics (IMGT), AbM и наблюдаемых контактов антигенов («Contact»). В некоторых вариантах осуществления CDR определяются в соответствии с определением Contact. См., MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745, 1996. В некоторых вариантах осуществления CDR определяются комбинацией определений Kabat, Chothia и/или Contact CDR.

Термин «эпитоп» относится к области или области антигена, с которой молекула, например, CDR антитела, специфически связывается, и может включать несколько аминокислот или части нескольких аминокислот, например, 5 или 6 или более, например, 20 или более аминокислот или частей этих аминокислот. В некоторых случаях эпитоп включает в себя небелковые компоненты, например, выбранные из углевода, нуклеиновой кислоты или липида. В некоторых случаях эпитоп представляет собой трехмерный фрагмент. Так, например, когда мишенью является белок, эпитоп может состоять из последовательных аминокислот (например, линейного эпитопа) или аминокислот из разных частей белка, которые сближаются при укладке белка (например, прерывистый или конформационный эпитоп).

Используемая в данном документе фраза «распознает эпитоп», используемая в отношении антитела, означает, что CDR антитела взаимодействуют или специфически связываются с антигеном в этом эпитопе или части антигена, содержащей этот эпитоп.

«Гуманизованное антитело» представляет собой химерный иммуноглобулин, полученный из не относящегося к человеку источника (например, мышинный), который содержит минимальные последовательности, полученные из не относящегося к человеку

иммуноглобулина вне CDR. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по меньшей мере один (например, два) переменный домен(-ы), в котором области CDR по существу соответствуют областям иммуноглобулина не относящегося к человеку животного, а каркасные области по существу соответствуют областям последовательности иммуноглобулина человека. В некоторых случаях некоторые остатки каркасной области человеческого иммуноглобулина могут быть заменены соответствующими остатками отличного от человека вида, например, для улучшения специфичности, аффинности и/или периода полужизни в сыворотке. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, последовательность иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антител известны в данной области техники.

«Человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее последовательности тяжелой и легкой цепей человека, обычно полученные из генов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело продуцируется клеткой человека, животным, отличным от человека, которое использует репертуар антител человека (например, трансгенные мыши, которые генетически сконструированы для экспрессии последовательностей антител человека) или платформами фагового дисплея.

Термин «специфически связывается» относится к молекуле, например, антителу, как описано в данном документе, которое, которая связывается с эпитопом или мишенью с большей аффинностью, большей авидностью и/или большей продолжительностью с этим эпитопом или мишенью в образце, чем она связывается с другим эпитопом или нецелевым соединением (например, структурно другим антигеном). В некоторых вариантах осуществления молекула, которая специфически связывается с эпитопом или мишенью, представляет собой молекулу, которая связывается с эпитопом или мишенью с по меньшей мере в 5 раз большей аффинностью, чем с другими эпитопами или нецелевыми соединениями, например, с по меньшей мере в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или большей аффинностью. Термин «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «является специфичным в отношении» конкретного эпитопа или мишени, используемый в данном документе, может проявляться, например, молекулой, имеющей равновесную константу диссоциации K_D для эпитопа или мишени, с которыми она связывается, например, 10^{-4} М или меньше, например, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, или 10^{-12} М. Специалисту в данной области техники будет понятно, что молекула, которая специфически связывается с мишенью одного вида, могут также специфически связываться с

ортологами этой мишени.

В контексте данного документа термин «аффинность связывания» для обозначения силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, между антителом, как описано в данном документе, и антигеном. Таким образом, например, этот термин может относиться к взаимодействиям 1:1 между антителом и антигеном, если не указано иное или не ясно из контекста. Аффинность связывания может быть определена количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ M⁻¹). K_D можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплекса, например, с использованием методов поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, системы Biacore™; анализ кинетического исключения, такие как KinExA®; и интерферометрии BioLayer (например, с использованием платформы ForteBio® Octet). В контексте данного документа термин «аффинность связывания» включает не только формальную аффинность связывания, такую как та, которая отражает 1:1 взаимодействия между антителом и антигеном, но также кажущуюся аффинность, для которой рассчитывают K_D , которая может отражать avidное связывание.

В контексте данного документа термин «трансферриновый рецептор» или «TfR» относится к белку 1 трансферринового рецептора. Последовательность полипептида трансферринового рецептора 1 человека представлена в SEQ ID NO:150. Также известны последовательности белка 1 рецептора трансферрина от других видов (например, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резус, NP_001244232.1; собака, NP_001003111.1; крупный рогатый скот, NP_001193506.1; мышь, NP_035768.1; крыса, NP_073203.1 и курица, NP_990587.1). Термин «рецептор трансферрина» также включает аллельные варианты иллюстративных эталонных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе рецептора трансферринового белка 1. Полноразмерный белок рецептор трансферрина включает короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и большой внеклеточный домен. Внеклеточный домен характеризуется тремя доменами: протеазоподобным доменом, спиральным доменом и апикальным доменом.

В контексте данного документа термин «полипептид Fc» относится к C-концевой области природного полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig в виде структурного домена. Полипептид Fc содержит последовательности константной области, включая по меньшей мере домен CH2 и/или домен CH3, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области, но не

содержит вариабельную область.

«Модифицированный полипептид Fc» относится к полипептиду Fc, который имеет по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью полипептида Fc тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа, но сохраняет общую укладку Ig или структуру нативного полипептида Fc.

В контексте данного документа термин «FcRn» относится к неонатальному Fc-рецептору. Связывание полипептидов Fc с FcRn снижает клиренс и увеличивает время полужизни полипептида Fc в сыворотке. Белок FcRn человека представляет собой гетеродимер, который состоит из белка размером около 50 кДа, который подобен белку главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС), и β 2-микроглобулину размером около 15 кДа.

В контексте данного документа термин «сайт связывания FcRn» относится к области полипептида Fc, которая связывается с FcRn. В IgG человека сайт связывания FcRn, пронумерованный с использованием индекса EU, включает L251, M252, I253, S254, R255, T256, M428, H433, N434, H435, и Y436. Эти положения соответствуют положениям с 21 по 26, 198 и с 203 по 206 SEQ ID NO:95.

В контексте данного документа термин «нативный сайт связывания FcRn» относится к области полипептида Fc, которая связывается с FcRn и имеет ту же аминокислотную последовательность, что и область природного полипептида Fc, которая связывается с FcRn.

В контексте данного документа термины «домен CH3» и «домен CH2» относятся к полипептидам домена константной области иммуноглобулина. В целях этой заявки полипептид домена CH3 относится к сегменту аминокислот приблизительно от положения 341 приблизительно до положения 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, а полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот приблизительно от положения 231 приблизительно до положения 340, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, и не содержит последовательности шарнирной области. Полипептиды доменов CH2 и CH3 также могут быть пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация доменов CH2 соответствует 1–110, а нумерация доменов CH3 соответствует 1–107, согласно Научной системе нумерации IMGT (веб-сайт IMGT). Домены CH2 и CH3 являются частью области Fc иммуноглобулина. Область Fc относится к сегменту аминокислот приблизительно до положения 231 приблизительно до положения 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, но в контексте данного документа может включать по меньшей мере часть шарнирной области антитела.

Иллюстративная последовательность шарнирной области представляет собой шарнирную последовательность человеческого IgG1 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:96).

Термины «дикий тип», «нативный» и «природный», используемые в отношении домена СН3 или СН2, относятся к домену, который имеет последовательность, встречающуюся в природе.

В контексте данного документа термин «мутант», используемый в отношении мутантного полипептида или мутантного полинуклеотида, используется взаимозаменяемо с «вариантом». Вариант по отношению к заданной эталонной последовательности домена СН3 или СН2 дикого типа может включать природные аллельные варианты. «Неприродный» домен СН3 или СН2 относится к варианту или мутантному домену, который не присутствует в клетке в природе и который получают путем генетической модификации, например с помощью технологии генной инженерии или методик мутагенеза, нативного полинуклеотида или полипептида домена СН3 или домена СН2. «Вариант» включает любой домен, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию по отношению к дикому типу. Мутации могут включать замены, вставки и делеции.

Термин «выделенный», используемый со ссылкой на нуклеиновую кислоту или белок, означает, что нуклеиновая кислота или белок, по существу, свободны от других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Это предпочтительно в гомогенном состоянии. Чистоту и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, таких как электрофорез (например, электрофорез в полиакриламидном геле) или хроматография (например, высокоэффективная жидкостная хроматография). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или белок имеет чистоту по меньшей мере 85%, чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95% или чистоту по меньшей мере 99%.

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позднее модифицируются, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Природные α -аминокислоты включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин

(Tyr) и их комбинации. Стереизомеры природных α -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser), D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации. Аминокислотные аналоги представляют собой соединения, которые обладают такой же базовой химической структурой, что и природные аминокислоты, т.е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют сходную базовую химическую структуру со природными аминокислотами. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно природной аминокислоте. Аминокислоты могут называться в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Термины «полипептид» и «пептид» взаимозаменяемо используются в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и неприродным аминокислотным полимерам. Аминокислотные полимеры могут включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду, или димеру (т.е. из двух), или мультимеру (т.е. из трех или более) одноцепочечных полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, например, дисульфидной связью или посредством нековалентных взаимодействий.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» взаимозаменяемо относятся к цепям нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть

включен в цепь ДНК- или РНК-полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Примеры рассматриваемых в данном документе полинуклеотидов включают одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и гибридные молекулы, содержащие смеси одноцепочечной и двухцепочечной ДНК и РНК.

Термины «консервативная замена» и «консервативная мутация» относятся к изменению, которое приводит к замене аминокислоты на другую аминокислоту, которая может быть отнесена к категории обладающих аналогичным свойством. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определяемых таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовую кислоту или E), Asp (аспарагиновую кислоту или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и His (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также можно выделить подгруппы. Например, группу заряженных или полярных аминокислот можно подразделить на подгруппы, включающие: «положительно заряженную подгруппу», включающую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», включающую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», включающую Asn и Gln. В другом примере ароматическую или циклическую группу можно подразделить на подгруппы, включающие: «подгруппу азотного кольца», включающую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», включающую Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическую группу можно подразделить на подгруппы, например, «алифатическую неполярную подгруппу», включающую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», включающую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в подгруппах, указанных выше, такие как, без ограничения: Lys вместо Arg или наоборот, так, чтобы можно было сохранить положительный заряд; Glu вместо Asp или наоборот, так, чтобы можно было сохранить отрицательный заряд; Ser вместо Thr или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -ОН; и Gln вместо Asn или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -NH₂. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты заменяют на природную гидрофобную аминокислоту, например, в активном сайте, чтобы сохранить гидрофобность.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более

полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков, например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием алгоритма сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна аминокислотная последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить, используя различные методы, доступные специалисту в данной области техники, например визуальное выравнивание, или используя общедоступное программное обеспечение с использованием известных алгоритмов для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники может определить параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания. Для сравнения полипептидных последовательностей в целях данной заявки используют алгоритм BLASTP стандартного BLAST для белков для выравнивания двух белковых последовательностей с параметрами по умолчанию.

Термины «соответствующий», «определенный со ссылкой на» или «пронумерованный со ссылкой на», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной последовательности, относятся к положению остатка указанной эталонной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с эталонной последовательностью. Таким образом, например, аминокислотный остаток в модифицированном полипептиде Fc «соответствует» аминокислоте в SEQ ID NO:95, когда остаток выравнивается с аминокислотой в SEQ ID NO:95 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:95. Полипептид, который выровнен с эталонной последовательностью, не обязательно должен иметь ту же длину, что и эталонная последовательность.

Термины «субъект», «индивид» и «пациент», взаимозаменяемо используемые в данном документе, относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим,

людей, отличных от человека приматов, грызунов (например, крыс, мышей и морских свинок), кроликов, коров, свиней, лошадей и другие виды млекопитающих. В одном варианте осуществления пациент представляет собой человека.

Термины «лечение», «лечить» и тому подобное используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. «Лечить» или «лечение» может относиться к любым признакам успеха в лечении или облегчении злокачественного новообразования (например, HER2-положительного и/или метастатического рака) включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление, ремиссия, улучшение выживаемости пациентов, увеличение времени или показателя выживаемости, уменьшение симптомов или повышение переносимости заболевания пациентом, замедление скорости дегенерации или ухудшения или улучшение физического или психического состояния пациента. Лечение или облегчении симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не проходящих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в другое время во время лечения.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к неактивному фармацевтическому ингредиенту, который является биологически или фармакологически совместимым для применения людьми или животными, такому как, но не ограничиваясь этим, буфер, носитель или консервант.

В контексте данного документа термин «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» молекулы (например, антитела, как описано в данном документе), в контексте данного документа, представляет собой количество молекулы, достаточное для лечения, ослабления, облегчения или уменьшения тяжести симптомов заболевания у субъекта.

Термин «вводить» относится к способу доставки молекул или композиций к желаемому месту биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутривенную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления антитела, описанное в данном документе, вводят внутривенно.

III. Антитела к HER2

В одном аспекте предложены антитела, которые связываются как с субдоменом II, так и с субдоменом IV HER2 человека, содержащим полипептид общей легкой цепи. В

некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc антител представляют собой модифицированный полипептид Fc (например, модифицированный для стимулирования связывания TfR и/или для усиления гетеродимеризации полипептидов Fc). Схематическое изображение такого биспецифического антитела показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER2 содержит:

- (a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека;
- (b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека; и
- (c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TfR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

В других вариантах осуществления антитело к HER2 содержит:

- (a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека;
- (b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека; и
- (c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TfR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит модифицированный домен CH3, содержащий TfR-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен CH3 содержит замены в наборе аминокислотных положений, как описано в данном документе, которые создают TfR-связывающий сайт.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого полипептида Fc и второго полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации. Например, первый полипептид Fc может содержать замену T366W, а второй полипептид Fc может содержать замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В еще одном примере первый полипептид Fc может содержать замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc может содержать замену T366W в соответствии с нумерацией EU. Кроме того, первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо могут содержать модификации, которые снижают

опосредованную TfR эффекторную функцию, т.е. снижают эффекторную функцию при связывании TfR. Например, модификациями, которые снижают опосредованную TfR эффекторную функцию, являются (i) замены L234A и L235A или (ii) замены L234A и L235A и замена P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU. В определенных других вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D и/или I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU. В конкретных вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc, независимо содержащие замену S239D и/или I332E, способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию, т.е. усиливать эффекторную функцию при связывании HER2.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с

положении 332.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит TfR-связывающий сайт, замены T366W, замены L234A и L235A (необязательно включая замену P329G или P329S) и необязательно замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU, и второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V и необязательно замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU. Например, первый полипептид Fc может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:74–84, 86 и 98, а второй полипептид Fc может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:71–73, 85 и 99–100.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит TfR-связывающий сайт и содержит замены L234A и L235A (необязательно включая замену P329G или P329S), а второй полипептид Fc не включает замены L234A или L235A (или замену P329G или P329S, если она присутствует в первом полипептиде Fc) в соответствии с нумерацией EU. В некоторых других вариантах реализации первый полипептид Fc содержит TfR-связывающий сайт и не включает замены L234A или L235A (или замены P329G или P329S, если она присутствует во втором полипептиде Fc), а второй полипептид Fc содержит замены L234A и L235A (необязательно включая замену P329G или P329S) в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления у одного или обоих полипептидов Fc может быть удален С-концевой лизин (например, остаток Lys в положении 447 полипептида Fc в соответствии с нумерацией EU). В некоторых вариантах осуществления удаление С-концевых лизинов в полипептидах Fc может улучшить стабильность антитела.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из: X₁ в SEQ ID NO:

89 не представляет собой T; X₂ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой F; X₃ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T; X₁ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N; X₂ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N; X₃ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой S; X₄ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G; X₅ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G; X₆ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой Q; X₁ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой L; X₂ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой G; X₃ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой P; и X₄ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой S.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89., где X₁ представляет собой N, K, M, или H. В некоторых вариантах осуществления CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₆ представляет собой R, H, или T. В некоторых вариантах осуществления CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой W, F, D, L, или Y. В некоторых вариантах осуществления CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;
- (b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q; и
- (c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;
- (b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к HER2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3 и 60–70. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека в антителе к

HER2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3 и 60–70.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17;
и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека в антителе к HER2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт для субдомена IV HER2 человека в антителе к HER2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность SEQ ID NO:15.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи в первом и втором антигенсвязывающих сайтах, т.е. один для субдомена II HER2, а

другой для субдомена IV HER2, в антителе к HER2 содержит одну или более (например, одну, две, или все три) CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит одну или более (например, одну, две или все три) CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; и

(с) CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и необязательно дополнительно содержит один или более (например, одну или обе) CDR, выбранных из группы, состоящей из: CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11; и CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12. В конкретных вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14 и необязательно дополнительно содержит одну или более (например, одну или обе) CDR, выбранных из группы, состоящей из: CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; и CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность легкой цепи содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER2 содержит CDR тяжелой и легкой цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 1, т.е. любую из комбинаций #A-AC.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(а) первая тяжелая цепь содержит CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18;

(b) вторая тяжелая цепь содержит CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4 и 49–52, CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:5–6 и 53–

55, и CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:7–8 и 56–59; и

(с) легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:13–14.

В определенных вариантах осуществления антитела к HER2 первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:15; второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1–3 и 60–70; первый полипептид Fc включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:74–84, 86 и 98; и полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:9–10 и 19. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

В определенных других вариантах осуществления антитела к HER2 первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1–3 и 60–70; второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; первый полипептид Fc включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74–84, 86 и 98; и полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:9–10 и 19. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER2 содержит первую тяжелую цепь для связывания с субдоменом II или IV HER2 человека, вторую тяжелую цепь для связывания с другим субдоменом HER2 и две идентичные легкие цепи.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER2 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями, выбранными из комбинаций, перечисленных в таблице 2, т.е. с любой из комбинаций # А-АТ.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(aj) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:37, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:27, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(ak) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:31, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:36, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(al) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:31, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:35, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(am) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:38, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:36, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(an) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:32, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:36, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(ao) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:32, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:35, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(ap) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:39, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:46, и легкая цепь включает SEQ ID NO:10;

(aq) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:20, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:24, и легкая цепь включает SEQ ID NO:19;

(ar) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:21, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:24, и легкая цепь включает SEQ ID NO:19;

(as) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:22, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:24, и легкая цепь включает SEQ ID NO:19; или

(at) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:23, вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:24, и легкая цепь включает SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER2 содержит первую тяжелую цепь, содержащую последовательность V_H и Fc , каждая из которых имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательностей с аминокислотными последовательностями, выбранными из комбинаций в таблице 3, т.е. любой из комбинаций # A-L, и вторую тяжелую цепь, содержащую последовательность V_H и Fc , каждая из которых имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями, выбранными из комбинаций в таблице 4, т.е. любую из комбинаций # A-L. В любой из этих комбинаций тяжелых цепей полипептидная последовательность легкой цепи имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:9–10 и 19.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

- (a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;
- (b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;
- (c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;
- (d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;
- (e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;
- (f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;
- (g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;
- (h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;
- (i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;
- (j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;
- (k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или
- (l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

- (a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;
- (b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;
- (c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;
- (d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;
- (e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь

включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь

включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 71, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(с) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(с) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 72, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

- (a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;
- (b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;
- (c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;
- (d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;
- (e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;
- (f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;
- (g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;
- (h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;
- (i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;
- (j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;
- (k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или
- (l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

- (a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;
- (b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;
- (c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;
- (d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;
- (e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь

включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 73, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь

включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:1 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

(c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;

(d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;

(e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;

(f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;

(g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;

(h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;

(i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;

(j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;

(k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или

(l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:2 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В конкретных вариантах осуществления этого антитела:

(a) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 86;

(b) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 74;

- (c) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 75;
- (d) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 76;
- (e) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 77;
- (f) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 78;
- (g) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 79;
- (h) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 80;
- (i) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 81;
- (j) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 82;
- (k) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 83; или
- (l) первая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:3 и 85, и вторая тяжелая цепь включает SEQ ID NO:15 и 84.

В некоторых других вариантах осуществления антитело к HER2 содержит первую тяжелую цепь, содержащую последовательность V_H и Fc , каждая из которых имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательностей с аминокислотными последовательностями, выбранными из комбинаций в таблице 5, т.е. любой из комбинаций # A-AJ, и вторую тяжелую цепь, содержащую последовательность V_H и Fc , каждая из которых имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями, выбранными из комбинаций в таблице 6, т.е. любую из комбинаций # A-D. В любой из этих комбинаций тяжелых цепей полипептидная последовательность легкой цепи имеет по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:9–10 и 19.

IV. Полипептиды FC и их модификации

В некоторых аспектах любое из антител, описанных в данном документе, содержит

димер полипептида Fc, в котором один или оба полипептида Fc в димере содержат аминокислотные модификации по сравнению с полипептидом Fc дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот в полипептиде Fc (например, модифицированном полипептиде Fc) могут приводить к связыванию димера полипептида Fc с рецептором ГЭБ (например, TfR), способствовать гетеродимеризации двух полипептидов Fc в димере, модулировать эффекторную функцию, увеличивать период полужизни в сыворотке, влиять на гликозилирование и/или снижать иммуногенность у человека. В некоторых вариантах осуществления полипептиды Fc, присутствующие в антителе, независимо имеют идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с соответствующим полипептидом Fc дикого типа (например, полипептидом Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). Примеры и описания модифицированных полипептидов Fc (например, TfR-связывающих полипептидов Fc) можно найти, например, в международной патентной публикации № WO 2018/152326, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Модификации полипептида Fc для связывания рецептора ГЭБ

В данном документе предложены антитела к HER2, которые способны транспортироваться через ГЭБ. Такой белок содержит модифицированный полипептид Fc, который связывается с рецептором ГЭБ. Рецепторы ГЭБ экспрессируются на эндотелии ГЭБ, а также в других типах клеток и тканей. В некоторых вариантах осуществления рецептор ГЭБ представляет собой TfR. Модифицированный полипептид Fc, который связывается с TfR, также упоминается как имеющий сайт связывания TfR.

Аминокислотные остатки, обозначенные в различных модификациях Fc, включая те, которые введены в модифицированный полипептид Fc, который связывается с рецептором ГЭБ, например, TfR, пронумерованы в данном документе с использованием нумерации по индексу EU. Любой полипептид Fc, например, полипептид Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, может иметь модификации, например замены аминокислот в одном или более положениях, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления домен, который модифицирован для обеспечения активности связывания с рецептором ГЭБ (например, TfR), представляет собой домен CH3 Ig человека, такой как домен CH3 IgG1. Домен CH3 может относиться к любому подтипу IgG, то есть IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG1 домен CH3 относится к сегменту аминокислот от положения около 341 до положения около 447, пронумерованному в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc,

который специфически связывается с TfR, связывается с апикальным доменом TfR и может связываться с TfR, не блокируя или иным образом не ингибируя связывание трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR существенно не ингибируется. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 50% (например, менее чем на около 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, или 5%).

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит одну или более, по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных положениях, включающих 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных положениях, включающих 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288, 289 и 290, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных положениях, включающих 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294, 296 и 300, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных положениях, включающих 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных положениях, включающих 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439, и 440, в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор

ГЭБ (например, TfR), присутствующий в антителе, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных положениях 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит по меньшей мере одно положение, имеющее замену относительно SEQ ID NO:95, как указано ниже: Leu, Tyr, Met или Val в положении 384; Leu, Thr, His или Pro в положении 386; Val, Pro или кислая аминокислота в положении 387; ароматическая аминокислота, например, Trp или Gly (например, Trp) в положении 388; Val, Ser или Ala в положении 389; кислая аминокислота, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro в положении 413; Thr или кислая аминокислота в положении 416; или Trp, Tyr, His или Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), может содержать консервативную замену, например, аминокислоту в той же зарядовой группе, группе гидрофобности, группе структуры кольца боковой цепи (например, ароматические аминокислоты) или группе размера и/или полярной или неполярной группе указанной аминокислоты в одном или более положениях в наборе. Так, например, Ile может находиться в положении 384, 386 и/или положении 413. В некоторых вариантах осуществления кислая аминокислота в положениях один, два или в каждом из положений 387, 413 и 416 представляет собой Glu. В других вариантах осуществления кислая аминокислота в одном, двух или каждом из положений 387, 413 и 416 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления два, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь положений 384, 386, 387, 388, 389, 413, 416 и 421 имеют аминокислотную замену, как указано в этом абзаце.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, имеющий модификации в аминокислотных положениях 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и/или 421, содержит нативный Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala или Asp в положении 390. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит одну, две, три или четыре замены в положениях, включающих 380, 391, 392 и 415. В некоторых вариантах осуществления Trp, Tyr, Leu или Gln могут находиться в положении 380. В некоторых вариантах осуществления Ser, Thr, Gln или Phe могут находиться в положении 391. В некоторых вариантах осуществления Gln, Phe или His могут находиться в положении 392. В некоторых вариантах осуществления Glu может находиться в положении 415.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит два, три, четыре,

пять, шесть, семь, восемь, девять или десять положений, выбранных из следующих: Trp, Leu или Glu в положении 380; Tyr или Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser, Ala, Val или Asn в положении 389; Ser или Asn в положении 390; Thr или Ser в положении 413; Glu или Ser в положении 415; Glu в положении 416; и/или Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит все одиннадцать положений следующим образом: Trp, Leu или Glu в положении 380; Tyr или Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser, Ala, Val или Asn в положении 389; Ser или Asn в положении 390; Thr или Ser в положении 413; Glu или Ser в положении 415; Glu в положении 416; и/или Phe в положении 421.

В определенных вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит Leu или Met в положении 384; Leu, His или Pro в положении 386; Val на положении 387; Trp в положении 388; Val или Ala в положении 389; Pro в положении 413; Thr в положении 416; и/или Trp в положении 421. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит Ser, Thr, Gln или Phe в положении 391. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в положении 380 и/или Gln, Phe или His в положении 392. В некоторых вариантах осуществления Trp находится в положении 380 и/или Gln находится в положении 392. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептором BBB (например, TfR), не имеет Trp в положении 380.

В других вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu или Val в положении 387; Trp в положении 388; Ser в положении 389; Ser или Thr в положении 413; Glu в положении 416; и/или Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит нативный Asn в положении 390. В определенных вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в положении 380; и/или Glu в положении 415. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит Trp в положении 380 и/или Glu в положении 415.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит одну или более из следующих замен: Trp в положении 380; Thr в положении 386; Trp в положении 388; Val в положении 389; Ser или Thr в положении 413; Glu в положении 415; и/или Phe в положении 421.

В дополнительных вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), дополнительно содержит одно, два или три положения,

выбранные из следующего: положение 414 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; положение 424 представляет собой Ser, Thr, Glu или Lys; и положение 426 представляет собой Ser, Trp или Gly.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеет последовательность SEQ ID NO:97. В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, один из двух полипептидов Fc в димере полипептида Fc может представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеющий последовательность SEQ ID NO:97, в то время как другой полипептид Fc в димере полипептида Fc может иметь последовательность полипептида Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:95). В других вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеющий последовательность SEQ ID NO:97.

В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат Trp в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ser в положении 389, Ser в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:74–84, 86, и 97–101.

В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, один из двух полипептидов Fc в димере полипептида Fc может представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержащий Trp в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ser в положении 389, Ser в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:97, в то время как другой полипептид Fc в димере полипептида Fc может иметь последовательность полипептида Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:95).

В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат Trp в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ala в положении 389, Thr в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности

с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:101-105.

В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, один из двух полипептидов Fc в димере полипептида Fc может представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержащий Tyr в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ala в положении 389, Thr в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:101, в то время как другой полипептид Fc в димере полипептида Fc может иметь последовательность полипептида Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:95).

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеет последовательность SEQ ID NO:101. В некоторых вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, один из двух полипептидов Fc в димере полипептида Fc может представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеющий последовательность SEQ ID NO:101, в то время как другой полипептид Fc в димере полипептида Fc может иметь последовательность полипептида Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:95). В других вариантах осуществления антител, описанных в данном документе, оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут представлять собой полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), имеющий последовательность SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR), содержит следующие замены, перечисленные в таблице А ниже (в соответствии с нумерацией EU):

Таблица А

	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
СНЗС.35.20.1	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20.2	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20.3	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20.4	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20.5	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20.6	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.a.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.23.1	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.23.2	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.23.3	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.

	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
СНЗС.35.23.4	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.23.5	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.23.6	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.1	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.2	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.3	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.4	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.5	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17.6	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.20	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.22	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	F	.	.
СНЗС.35.23	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.24	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.21.17	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
СНЗС.35.N390	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	F	.	.
СНЗС.35.20.1.1							F		T	E	W	S	S					S		E	E					F		
СНЗС.35.23.2.1							Y		T	E	W	A						S		E						F		
СНЗС.35.23.1.1							F		T	E	W	S						S		E	E					F		
СНЗС.35.S413							Y		T	E	W	S	S					S		E						F		
СНЗС.35.23.3.1							Y		T	E	W	V						S		E	E					F		
СНЗС.35.N390.1							Y		T	E	W	S						S		E						F		
СНЗС.35.23.6.1							F		T	E	W	V						S		E	E					F		

Модификации полипептида Fc для гетеродимеризации

В некоторых вариантах осуществления полипептиды Fc, присутствующие в любом антителе, описанном в данном документе, включают мутации по типу «выступ» и «впадина», способствующие образованию гетеродимера и препятствующие образованию гомодимера. Как правило, модификации вводят выпуклость («выступ») на поверхности взаимодействия первого полипептида и соответствующую полость («впадину») на поверхности взаимодействия второго полипептида, так что выступ можно расположить в полости таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимера и, таким образом, препятствовать образованию гомодимера. Выступы конструируются путем замены небольших боковых цепей аминокислот с поверхности взаимодействия первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). На поверхности взаимодействия второго полипептида создаются компенсирующие полости идентичного или подобного размера выступам путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные мутации находятся в положении полипептида Fc, которое не оказывает отрицательного влияния на связывание полипептида с рецептором

ГЭБ, например, TfR.

В одном иллюстративном варианте осуществления подхода «выступ-во-впадину» для димеризации положение 366 (нумерация в соответствии со схемой нумерации EU) одного из полипептидов Fc, присутствующих в антителе, содержит триптофан вместо нативного треонина. Другой полипептид Fc в димере имеет валин в положении 407 (нумерация согласно схеме нумерации EU) вместо нативного тирозина. Другой полипептид Fc может дополнительно содержать замену, в которой нативный треонин в положении 366 (нумерация согласно схеме нумерации EU) заменен серином, а нативный лейцин в положении 368 (нумерация согласно схеме нумерации EU) заменен аланином. Таким образом, один из полипептидов Fc антитела, описанного в данном документе, имеет мутацию по типу «выступ» T366W, а другой полипептид Fc имеет мутацию Y407V, которая, как правило, сопровождается мутациями по типу «впадина» T366S и L368A.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые содержатся в антителе, также могут быть сконструированы так, чтобы они содержали другие модификации для гетеродимеризации, например, модификацию электростатических взаимодействий контактных остатков на поверхности взаимодействия СНЗ-СНЗ, которые представляют собой модификации естественно заряженных или гидрофобных участков.

Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, который имеет один полипептид Fc, имеющий мутацию по типу «выступ» T366W, и по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности с последовательностью SEQ ID NO:107, и другой полипептид Fc, имеющий мутации по типу «впадина» T366S, L368A и Y407V, и по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут представлять собой TfR-связывающий полипептид Fc. В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, который имеет (i) первый полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:85, и (ii) второй полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:98. В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, который имеет (i) первый полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:85, и (ii) второй полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:102.

Модификации полипептида Fc для модулирования эффекторной функции

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые

содержатся в любом антителе, описанном в данном документе, могут содержать модификации, снижающие T_fR-опосредованную эффекторную функцию при связывании T_fR, т.е. обладающие сниженной способностью индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, которая опосредует эффекторную функцию. Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются ими, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток. Эффекторные функции могут различаться в зависимости от класса антител. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активность ADCC и CDC при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим в клетке иммунной системы; и нативные человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 могут вызывать функции ADCP при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые содержатся в антителе, описанном в данном документе, могут содержать модификации, снижающие или устраняющие T_fR-опосредованную эффекторную функцию. Иллюстративные мутации полипептида Fc, которые снижают T_fR-опосредованную эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, замены в домене CH₂, например, в положениях 234 и 235, в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут содержать остатки аланина в положениях 234 и 235. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены L234A и L235A (также называемые в данном документе «LALA»).

Дополнительные мутации полипептида Fc, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, следующее: положение 329 может иметь мутацию, в которой пролин замещен глицином, аланином, серином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения поверхности контакта Fc/Fc γ -рецептора, которая образуется между пролином 329 из Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 из Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D, и P331S в соответствии со схемой нумерации EU. Также могут присутствовать множественные замены, например, L234A и L235A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329G области Fc IgG1 человека; S228P и L235E области Fc IgG4 человека; L234A и G237A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и G237A области

Fc IgG1 человека; V234A и G237A области Fc IgG2 человека; L235A, G237A и E318A области Fc IgG4 человека; и S228P и L236E области Fc IgG4 человека, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут иметь одну или более аминокислотных замен, которые модулируют ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут иметь замены L234A, L235A и P329G или P329S в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в антителе, описанном в данном документе, могут содержать модификации, которые способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию при связывании HER2, т.е. усиливать способность индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, обеспечивающей эффекторную функцию. Примеры эффекторных функций антител описаны выше. Иллюстративные мутации полипептида Fc, которые способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию, включают, помимо прочего, замены в домене CH2, например, в положениях 239 и/или 332 в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут содержать аспарагиновую кислоту в положении 239 и/или глутаминовую кислоту в положении 332. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замену S239D и/или I332E в соответствии со схемой нумерации EU.

Конфигурация «цис-LALA»

В некоторых вариантах осуществления любого антитела, описанного в данном документе, только один из двух полипептидов Fc (но не оба полипептида Fc) из двух полипептидов Fc в антителе модифицирован для снижения TfR-опосредованной эффекторной функции при связывании TfR. Другой полипептид Fc не содержит TfR-связывающий сайт или каких-либо модификаций, снижающих эффекторную функцию. Димер полипептида Fc в антителе, который имеет только один из двух полипептидов Fc, содержащий как TfR-связывающий сайт, так и модификации, снижающие связывание Fc γ R (например, замены LALA) при связывании с TfR, в то время как другой полипептид Fc не содержит сайт связывания TfR или любые модификации, снижающие связывание Fc γ R, называются имеющими конфигурацию цис-LALA.

Например, в некоторых вариантах осуществления антитела, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:86, который имеет как TfR-связывающий сайт и замены LALA, а также модификацию по типу

«выступ», и (ii) второй полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, который имеет только модификацию по типу «впадина». В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, имеющий последовательность SEQ ID NO:103, который имеет как сайт связывания TfR и замены LALA, а также модификацию по типу «выступ», и (ii) второй полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, который имеет только модификацию по типу «впадина».

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, содержащий Ala в положении 234, Ala в положении 235, Trp в положении 366, Tyr в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ser в положении 389, Ser в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:86, и (ii) второй полипептид Fc, содержащий Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85.

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, содержащий Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, и (ii) второй полипептид Fc содержит Ala в положении 234, Ala в положении 235, Trp в положении 366, Tyr в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ser в положении 389, Ser в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421 в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:86.

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, содержащий Ala в положении 234, Ala в положении 235, Trp в положении 366, Tyr в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ala в положении 389, Thr в положении 413, Glu в положении 415,

Glu в положении 416 и Phe в положении 421, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:103, и (ii) второй полипептид Fc, содержащий Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85.

В конкретных вариантах осуществления антитела, описанное в данном документе, может содержать димер полипептида Fc, имеющий конфигурацию цис-LALA, который имеет (i) первый полипептид Fc, содержащий Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью SEQ ID NO:85, и (ii) второй полипептид Fc, содержащий Ala в положении 234, Ala в положении 235, Trp в положении 366, Tug в положении 384, Thr в положении 386, Glu в положении 387, Trp в положении 388, Ala в положении 389, Thr в положении 413, Glu в положении 415, Glu в положении 416 и Phe в положении 421, в соответствии с нумерацией EU, и последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:103.

Модификации полипептида Fc для продления времени полужизни в сыворотке

В некоторых вариантах осуществления в любое антитело, описанное в данном документе, могут быть введены модификации для увеличения периода полужизни в сыворотке. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в антителе, описанном в данном документе, могут содержать тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M252Y, S254T и T256E. В качестве альтернативы, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M428L и N434S, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU. В альтернативном варианте один или оба полипептида Fc могут содержать замену N434S или N434A.

Полипептид Fc с удаленным С-концевым остатком лизина

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанных в данном документе, у одного или обоих полипептидов Fc может быть удален С-концевой лизин (например, остаток Lys в положении 447 полипептида Fc в соответствии с нумерацией EU). С-концевой остаток лизина является высококонсервативным в иммуноглобулинах многих видов и может быть полностью или частично удален клеточным механизмом во время выработки белка. В некоторых вариантах осуществления удаление С-концевых лизинов в полипептидах Fc может улучшить стабильность антител.

V. Получение антител

Для получения описанного в данном документе антитела можно использовать многие методики, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи представляющего интерес антитела, можно клонировать из клетки, например, из гибридомы. Генные библиотеки, кодирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител, также могут быть получены из гибридомных или плазматических клеток. В качестве альтернативы можно использовать технологию фагового или дрожжевого дисплея для идентификации антител и фрагментов Fab, которые специфически связываются с выбранными антигенами.

Антитела могут быть получены с использованием любого количества систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как гибридома, или систему экспрессии клеток СНО. Многие такие системы широко доступны у коммерческих поставщиков. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие антитело, могут быть экспрессированы с использованием одного вектора, например, в дицистронной единице экспрессии или под контролем разных промоторов. В других вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие антитело, могут быть экспрессированы с использованием отдельных векторов.

В некоторых аспектах изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой из полипептидов, содержащих антитела, как описано в данном документе; векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты; и клетки-хозяева, в которые вводят нуклеиновые кислоты, используемые для репликации нуклеиновых кислот и/или для экспрессии антител.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который включает антитело, как описано в данном документе (например, как описано в разделе III выше). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей (например, последовательности тяжелой цепи, легкой цепи и/или полипептида Fc), описанные в неофициальном перечне последовательностей ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по

меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с последовательностью, описанной в неофициальном перечне последовательностей ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, описанный в данном документе, функционально связан с гетерологичной нуклеиновой кислотой, например, гетерологичным промотором.

Подходящие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению, или их фрагменты, включают векторы клонирования и векторы экспрессии. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, предназначенной для применения, полезные векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь одну мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и любой другой вектор.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии полинуклеотида или вектора, как описано в данном документе, включают прокариотические или эукариотические клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является прокариотической. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клетками яичника китайского хомяка (СНО) или лимфоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека, например клетку почки эмбриона человека (НЕК).

В еще одном аспекте предложены способы получения антитела, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе (например, клетки-

хозяина, экспрессирующей полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе), в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев). В некоторых вариантах осуществления антитело очищают, например, с помощью хроматографии.

VI. Терапевтические способы

В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения злокачественного новообразования (например, HER2-положительного злокачественного новообразования) или лечения метастазов в головном мозге при злокачественном новообразовании (например, HER2-положительного злокачественного новообразования) у субъекта путем введения субъекту терапевтически эффективного количества антитела, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции. В данном документе также предложены способы трансцитоза вариабельной области антитела, которая способна связывать HER2 (например, HER2 человека), или его антигенсвязывающего фрагмента, через эндотелий. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение эндотелия в контакт с композицией, содержащей антитела, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эндотелий представляет собой гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Неограничивающие примеры HER2-положительного злокачественного новообразования, которое можно лечить в соответствии со способами, представленными в данном документе, включают HER2-положительный рак молочной железы, яичников, мочевого пузыря, слюнных желез, эндометрия, поджелудочной железы и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), а также HER2-положительную аденокарциному желудка и/или HER2-положительную аденокарциному гастроэзофагеального соединения. В некоторых вариантах осуществления HER2-положительное злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления HER2-положительное злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительную аденокарциному желудка и/или HER2-положительную аденокарциному гастроэзофагеального соединения. В некоторых вариантах осуществления HER2-положительное злокачественное новообразование представляет собой метастатическое злокачественное новообразование.

В других аспектах в данном документе предложены способы лечения метастазов злокачественного новообразования (например, HER2-положительного злокачественного новообразования). В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, описанного в данном

документе. В некоторых вариантах осуществления метастазы представляют собой метастазы в головном мозге при HER2-положительном злокачественном новообразовании, описанном выше. В некоторых вариантах осуществления метастазы представляют собой метастазы в головном мозге при HER2-положительном раке молочной железы. В некоторых вариантах осуществления метастазы представляют собой метастазы в головном мозге при HER2-положительной аденокарциноме желудка и/или HER2-положительной аденокарциноме гастроэзофагеального соединения.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая выгода может включать уменьшение или замедление роста опухоли, уменьшение размера опухоли (например, объема), уменьшение жизнеспособности клеток опухоли, уменьшение количества метастатических поражений, облегчение одного или более признаков или симптомов злокачественного новообразования (например, HER2-положительного злокачественного новообразования), и/или увеличение выживаемости пациентов. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток опухоли, рост опухоли, размер опухоли и/или количество метастатических поражений уменьшается на по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более.

В некоторых вариантах осуществления антитело антагонизирует активность HER2. В некоторых вариантах осуществления, активность HER2 ингибируется (например, на по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более).

Способ введения антитела, описанного в данном документе, может быть пероральным, внутривенным, трансдермальным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутривенным, ингаляционным, местным, внутриочаговым, ректальным, внутрибронхиальным, назальным, трансмукозальным, кишечным, посредством введения в глаз или ухо или любым другим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят перорально, внутривенно или внутривенно.

VII. Фармацевтические композиции и наборы

В других аспектах предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие антитело в соответствии с изобретением.

Фармацевтические композиции

Руководство по приготовлению составов для применения в изобретении можно найти в ряде справочников по фармацевтическим препаратам и составам, которые известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, описанное в данном документе, и дополнительно содержит один или более

фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые не препятствуют активности активного агента или иным образом не ингибируют ее.

В некоторых вариантах осуществления антитело может быть приготовлен для парентерального введения путем инъекции. Как правило, фармацевтическая композиция для применения при *in vivo* введении является стерильной, например, была подвергнута термостерилизации, стерилизации паром, стерильной фильтрации или облучению.

Дозировки и необходимая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях, описанных данным документе, могут варьироваться в зависимости от конкретного предполагаемого использования.

Наборы

В некоторых вариантах осуществления предложен набор для применения в лечении злокачественного новообразования (например, HER2-положительного злокачественного новообразования), содержащий антитело, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело, как описано в данном документе, и дополнительно включает один или более дополнительных терапевтических агентов для применения в лечении злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит учебные материалы, содержащие указания (т.е. протоколы) для применения способов, описанных в данном документе (например, инструкции по применению набора для введения антитела). Хотя учебные материалы, как правило, содержат письменные или печатные материалы, это не ограничивается ими. Любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен данным изобретением. Такие носители информации включают, но не ограничиваются этим, электронные носители данных (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т.п. Такие носители информации могут включать адреса интернет-сайтов, на которых предоставлены такие инструктирующие материалы.

VIII. Примеры

Настоящее изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах. Следующие примеры ниже предлагаются только для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Получение биспецифических антител к HER2

Экспрессия и очистка вариантов рекомбинантных биспецифических антител

Экспрессионные плазмиды, состоящие из (i) полипептида тяжелой цепи, содержащего TfR-связывающий сайт и мутацию по типу «выступ» (T366W), (ii) полипептида тяжелой цепи, содержащего мутации по типу «впадина» (T366S/L368A/Y407V), и (iii) легких цепей согласно комбинации, представленные в таблице 2, котрансфецированы в клетки Expi293 или ExpiCHO. Варианты рекомбинантных биспецифических антител впоследствии очищают из кондиционированной среды путем нанесения супернатанта на колонку с белком А (GE Mab Select SuRe). Колонку промывают 10 колоночными объемами PBS, pH 7,4. Белки элюируют 50 mM цитратом натрия, pH 3,0, содержащим 150 mM NaCl, и немедленно нейтрализуют 200 mM аргинина, 137 mM янтарной кислоты, pH 5,0. Белки дополнительно очищают с помощью эксклюзионной хроматографии (GE Superdex200) с использованием 200 mM аргинина, 137 mM янтарной кислоты, pH 5,0 в качестве рабочего буфера. Очищенные белки подтверждают с помощью ЖХ/МС интактной массы, а чистоту >95% подтверждают с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической ВЭЖХ-ЭХ.

Полипептиды тяжелой цепи могут быть дополнительно подвергнуты процессингу во время получения клеточной культуры, так что С-концевой остаток лизина будет удален. Таким образом, биспецифические антитела, перечисленные в таблице 2, могут относиться к белковым молекулам, содержащим непроцессированные тяжелые цепи (т.е. содержащие С-концевой остаток лизина); белковым молекулам, содержащим одну или более тяжелых цепей, которые процессируются (т.е. С-концевой остаток лизина отсутствует); или смеси белковых молекул, имеющих процессированные и/или непроцессированные тяжелые цепи.

Пример 2. Оценка антител к HER2 с помощью Biacore

Аффинности связывания внеклеточного домена (ВКД) HER2 сконструированных антител к HER2 измеряли методом SPR с использованием прибора Biacore 8K. Антитела улавливали на сенсорных чипах Biacore™ Series S CM5, иммобилизованных с помощью мышинных античеловеческих Fab (набор для захвата человеческих Fab от GE Healthcare), с последующими инъекциями серийных 3-кратных разведений рекомбинантного ВКД HER2 со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали с использованием 3-минутной ассоциации с последующей 10-минутной диссоциацией. После каждой инъекции сенсорный чип регенерировали с использованием 50 mM глицинового буфера для регенерации, pH 2,0. Для анализа кинетики использовали модель Ленгмюра 1:1 с одновременной аппроксимацией значений k_{on} и k_{off} .

Анализировали консенсусную последовательность для контроля легкой цепи анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 87) и контроля легкой цепи анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 94). Структурный анализ продемонстрировал, что остаток Y в положении 91 участвует в структурной организации петель CDR для эффективного связывания D4 HER2, тогда как остаток H в том же положении менее вовлечен в связывание D2 HER2. После скрининга одиночных аминокислотных замен в положении 91 остатки Y и F в этом положении были выбраны для дальнейшего тестирования.

Последовательности легкой цепи анти-HER2 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO:9 и 10) были соединены с контрольной тяжелой цепью анти-HER2_D2 (SEQ ID NO:92) и контрольной тяжелой цепью анти-HER2_D4 (SEQ ID NO:93) для измерения K_D связывания HER2. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

LC	HC	Связывание HER2, K_D (нМ)
Контрольная легкая цепь анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 87)	Контрольная тяжелая цепь анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 92)	41
SEQ ID NO: 10		14
SEQ ID NO: 9		13
Контрольная легкая цепь анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 94)		2,9
Контрольная легкая цепь анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 87)	Контрольная тяжелая цепь анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 93)	3
SEQ ID NO: 10		1,7
SEQ ID NO: 9		1,5
Контрольная легкая цепь анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 94)		Отсутствие связывания

Легкие цепи SEQ ID NO: 9 и 10 продемонстрировали связывание HER2 в сочетании с контрольными тяжелыми цепями анти-HER2_D2 и D4. Легкие цепи SEQ ID NO: 9 и 10 продемонстрировали более низкую аффинность связывания HER2 (13 K_D и 14 K_D , соответственно) по сравнению с контрольной легкой цепью анти-HER2_D2 (2,9 K_D) в сочетании с контрольной тяжелой цепью анти-HER2_D2. Напротив, легкие цепи SEQ ID NO: 9 и 10 продемонстрировали более высокую аффинность связывания HER2 (1,5 K_D и 1,7 K_D , соответственно) по сравнению с контрольной легкой цепью анти-HER2_D4 (3 K_D) в сочетании с контрольной тяжелой цепью анти-HER2_D4.

Тринадцать аминокислотных положений в H1, H2 или H3 CDR контрольной тяжелой цепи анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 92) были выбраны на основе структурного анализа. Выбранные остатки были рандомизированы для поиска вариантов с заменой одной аминокислоты с улучшенным связыванием домена II ВКД HER2. Антитела с этими одиночными точечными мутациями соединяли с контрольной легкой цепью анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 87) и экспрессировали в клетках Expi293, а антитела в

супернатантах клеточных культур проверяли на связывание рекомбинантных ВКД HER2 с использованием SPR. Варианты с улучшенным доменом II ВКД HER2 были отобраны и экспрессированы с легкой цепью SEQ ID NO: 10 в клетках Expi293 и очищены для дополнительной оценки связывания SPR.

Последовательности тяжелой цепи анти-HER2_D2 с созревшей аффинностью, содержащие область V_H SEQ ID NO:1–2 и 60–70, соединяли с контрольной легкой цепью анти-HER2_D4 (SEQ ID NO:87) для измерения K_D связывания HER2. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

LC	HC	Связывание HER2, K _D (нМ)
Контрольная легкая цепь анти-HER2_D4 (SEQ ID NO: 87)	Контрольная тяжелая цепь анти-HER2_D2 (SEQ ID NO: 92)	42
	SEQ ID NO: 60	28
	SEQ ID NO: 61	17,5
	SEQ ID NO: 62	18,3
	SEQ ID NO: 63	22,1
	SEQ ID NO: 1	28
	SEQ ID NO: 64	21
	SEQ ID NO: 65	35
	SEQ ID NO: 66	32,3
	SEQ ID NO: 67	6,1
	SEQ ID NO: 68	9,8
	SEQ ID NO: 69	10,2
	SEQ ID NO: 2	28
	SEQ ID NO: 70	30

Последовательности тяжелой цепи анти-HER2_D2 с созревшей аффинностью, содержащие область V_H SEQ ID NO:1-2 и 60-70 в сочетании с контрольной легкой цепью анти-HER2_D4 (SEQ ID NO:87), продемонстрировали связывание HER2, и все они продемонстрировали улучшение связывания HER2 по сравнению с контролем тяжелой цепи анти-HER2_D2.

Последовательность легкой цепи анти-HER2 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO:10) соединяли с последовательностями тяжелой цепи анти-HER2_D2 с созревшей аффинностью, содержащими область V_H SEQ ID NO:1–3, для измерения K_D связывания HER2. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9

LC	HC	Связывание HER2, K _D (нМ)
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 1	4,2
	SEQ ID NO: 2	6,2
	SEQ ID NO: 3	2,1

Легкая цепь SEQ ID NO: 10, соединенная с последовательностями тяжелой цепи анти-HER2_D2 с созревшей аффинностью, содержащими область V_H SEQ ID NO: 1-3, продемонстрировала улучшенную аффинность связывания HER2 (4,2, 6,2, 2,1 K_D,

соответственно). Как обсуждалось выше и показано в таблице 7, контрольная легкая цепь анти-HER2_D2 в сочетании с контрольной тяжелой цепью анти-HER2_D2 имела аффинность связывания HER2 2,9 Кд. Таким образом, легкая цепь SEQ ID NO: 10, соединенная с последовательностями тяжелой цепи анти-HER2_D2 с созревшей аффинностью, содержащими область V_H SEQ ID NO: 3, связывает HER2 с более высокой аффинностью, чем контроль.

Пример 3. ADCC/ADCP биспецифических антител к HER2 *in vitro*

Набор Human ADCC Reporter Bioassay, вариант V (Promega G7018) использовали для оценки активации человеческого FcγRIIIa, тогда как набор Human FcγRIIIa ADCP Reporter Bioassay (Promega G9995) использовали для измерения активации репортера FcγRIIIa человека биспецифическими антителами согласно комбинации в таблице 10. В набор входят все компоненты, описанные ниже. Было протестировано несколько линий клеток с различными уровнями экспрессии HER2 и TfR. Клетки SKBR3 (ATCC HTB-30), ZR-75-30 (ATCC CRL-1504), BT-474 (ATCC HTB-20), OE-19 (Sigma 96071721), CHO-KI+HumanTfR (Соглашение о сотрудничестве между ChemPartner и CRO) культивировали в среде RPMI (Life Technologies 61870-036) с добавлением 10% FBS (бычьей сыворотки Hyclone SH30080.03) и 1% пенициллина-стрептомицина (Life Technologies 15140-122) до экспоненциальной фазы, дважды промывали PBS и ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Белые 96-луночные планшеты Nunc с высокой степенью связывания (ThermoFisher) покрывали 25 мкл среды, содержащей 50000 клеток/лунка.

Титры антител готовили в RPMI с добавлением 4% сыворотки с низким содержанием IgG, и 25 мкл на лунку добавляли в планшеты для опсонизации клеток, затем накрывали и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, 5% CO₂. Во время опсонизации антитела 3,5 мл среды предварительно нагревали до 37°C и репортерные по FcγR клетки быстро размораживали на водяной бане при 37°C, не переворачивая, затем добавляли к предварительно нагретой среде в конической пробирке емкостью 15 мл при осторожном перемешивании. После 30-минутной опсонизации репортерную по FcγR линию клеток добавляли в каждый планшет по 25 мкл на лунку и инкубировали в течение 6 часов (активация hFcγRIIIa и hFcγRIIa для SKBR3, ZR-75-30, BT-474) или 16 часов (hFcγRIIIa и hFcγRIIa для CHO-KI+huTfR) при 37°C, 5% CO₂. После инкубации планшетам давали уравниваться до комнатной температуры и добавляли 75 мкл на лунку суспензии субстрата люциферазы Bio-Glo (Promega) и измеряли люминесценцию на ридере Perkin Elmer Envision. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 10

		Цепь с «впадинами»							
		«впадина»	цепь. E	цепь. D	цепь. DE	цепь.PG	цепь. PG.D	цепь. PG.E	цепь.PG .DE
Цепь с «выступами»	цис- LALA.CH3C.35.23.4 .выступ	Fc1	Fc2	Fc3	Fc4	Fc5	Fc6	Fc7	Fc8
	цис- LALA.D.CH3C.35.2 3.4.выступ	Fc17	Fc18	Fc19	Fc20	Fc21	Fc22	Fc23	Fc24
	цис- LALA.E.CH3C.35.2 3.4.выступ	Fc25	Fc26	Fc27	Fc28	Fc29	Fc30	Fc31	Fc32
	цис- LALA.DE.CH3C.35. 23.4.выступ	Fc33	Fc34	Fc35	Fc36	Fc37	Fc38	Fc39	Fc40
	цис- LALAPG.CH3C.35. 23.4.выступ	Fc41	Fc42	Fc43	Fc44	Fc45	Fc46	Fc47	Fc48
	цис- LALAPG.D.CH3C.3 5.23.4.выступ	Fc49	Fc50	Fc51	Fc52	Fc53	Fc54	Fc55	Fc56
	цис- LALAPG.E.CH3C.3 5.23.4.выступ	Fc57	Fc58	Fc59	Fc60	Fc61	Fc62	Fc63	Fc64
	цис- LALAPG.DE.CH3C. 35.23.4.выступ	Fc65	Fc66	Fc67	Fc68	Fc69	Fc70	Fc71	Fc72

Таблица 11

Выполненный анализ	TfR- опосредованная ADCC	HER2-опосредованная ADCC			ADCP		
		CHO-hTfR	BT-474	OE19	ZR-75- 30	OE19	ZR-75-30
Используемая линия клеток	CHO-hTfR	BT-474	OE19	ZR-75- 30	OE19	ZR-75-30	SKBR3
Анти-HER2_D4 (контроль)	3,0E+04	4,3E+05	1,4E+06	4,8E+05	1,1E+05	3,6E+04	3,5E+04
Fc1	2,8E+04	1,5E+04	4,9E+05	3,5E+04	9,2E+05	1,6E+05	3,1E+05
Fc41	2,5E+04	3,9E+04	2,1E+05	2,8E+04	2,2E+05	8,9E+04	5,9E+04
Fc5	2,7E+04	3,3E+04	2,2E+05	3,0E+04		4,1E+04	3,8E+04
Fc45	2,6E+04	2,3E+04	7,1E+04	2,4E+04	1,5E+05	3,6E+04	3,3E+04
Fc42	2,7E+04	1,5E+05	6,5E+05	7,7E+04	2,6E+05	1,0E+05	5,7E+04
Fc52	2,5E+04	4,6E+05	1,2E+06	2,1E+05	2,3E+05	8,5E+04	5,8E+04
Fc44	2,6E+04	2,0E+05	7,3E+05	9,3E+04	1,6E+05	4,1E+04	3,9E+04
Fc50	2,9E+04	3,2E+05	2,6E+06	1,9E+05	1,6E+06	3,4E+05	2,5E+05
Fc68	2,9E+04	3,6E+05	1,8E+06	2,2E+05			
Fc7	2,7E+04	3,1E+04	3,0E+05	5,0E+04			
Fc24	1,4E+05	2,8E+05	1,6E+06	1,6E+05			
Fc8	2,7E+04	8,9E+04	8,2E+05	1,6E+05			
Fc40	2,5E+05	3,4E+05	2,0E+06	2,3E+05			
Fc23	7,2E+04	1,3E+05	1,1E+06	7,1E+04			
Fc25	4,8E+04			2,2E+05			
Fc2	2,3E+04			2,2E+05		1,6E+05	3,0E+05
Fc26	4,7E+04			3,4E+05			

Цель заключалась в разработке вариантов Fc, которые не повышали бы TfR-опосредованную ADCC по сравнению с контролем и/или Fc1 и которые также имели сопоставимый с контролем уровень HER2-опосредованной ADCC и/или улучшенный уровень HER2-опосредованной ADCC по сравнению с Fc1. Как показано выше в таблице 11, Fc1, Fc41, Fc5, Fc45, Fc42, Fc52, Fc44, Fc50, Fc68, Fc7, Fc8, Fc2, Fc34 и Fc4 все имели сравнимые уровни TfR-опосредованной ADCC на TfR-сверхэкспрессирующих клетках

CHO в качестве контроля. Fc50 и Fc52 продемонстрировали самый высокий уровень HER2-опосредованной ADCC среди всех протестированных линий клеток со сверхэкспрессией HER2 без увеличения Tfr-опосредованной активации ADCC.

Уровни ADCP вариантов Fc1, Fc41, Fc5, Fc45, Fc42, Fc52, Fc44 и Fc50 также приведены в таблице 11 по сравнению с контролем в линиях клеток, экспрессирующих HER2, т.е. OE19, ZR-75-30 и SKBR3.

Пример 4. Ингибирование роста *in vitro* биспецифических антител к HER2

Анализ ингибирования роста использовали для определения жизнеспособности клеток после обработки различными антителами в течение разных периодов времени. Было протестировано несколько линий клеток с различными уровнями экспрессии HER2 и Tfr. Клетки SKBR3 (ATCC HTB-30), ZR-75-30 (ATCC CRL-1504), BT-474 (ATCC HTB-20), OE-19 (Sigma 96071721), CHO-KI+HumanTfr (Соглашение о сотрудничестве между ChemPartner и CRO) культивировали в среде RPMI (Life Technologies 61870-036) с добавлением 10% FBS (бычьей сыворотки Hyclone SH30080.03) и 1% пенициллина-стрептомицина (Life Technologies 15140-122) до экспоненциальной фазы. После промывки PBS клетки ресуспендировали в концентрации $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в RPMI с дополнением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Черные планшеты, покрытые с поли-D-лизином, (Corning 354640) покрывали 100 мкл среды для культивирования клеток, содержащей 10000 клеток/лунка. Планшеты инкубировали в течение 24 часов в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO₂.

Титрования антител готовили в RPMI с 10% сыворотки FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Антитела добавляли в каждый планшет по 65 мкл на лунку, затем закрывали и инкубировали в течение 72 часов (только для линии клеток OE-19) и при 37°C, 5% CO₂. Для линий клеток BT-474 и ZR-75-30 добавляли дополнительные 65 мкл антитела через 72 часа, а затем инкубировали еще 72 часа при 37°C, 5% CO₂.

На 7-й день определяли рост клеток, используя 5 мкл реагента WST-1 (Sigma Aldrich) в 50 мкл питательной среды. Планшет инкубировали в течение 4 часов в присутствии реагента WST-1 и оптическую плотность определяли при 440 нм. Процент ингибирования роста/пролиферации рассчитывали на основе A440 нМ и нормализовали по необработанному контролю.

Результаты анализа ингибирования роста клеток ZR-75-30 для различных антител в таблице 12, а также значения IC50 и максимального % ингибирования роста показаны на фиг. 2. Каждое из биспецифических антител №2, №3, №4 и №5 показало улучшенное значение EC50/эффективность по сравнению с контролем. Биспецифические антитела №4 и 5 показали максимальный % ингибирования роста/эффективности, сравнимый с

контролем.

Таблица 12

	HC1	HC2	LC
Биспецифическое антитело №1 (контроль)	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 19
Биспецифическое антитело № 2	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 10
Биспецифическое антитело № 3	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 10
Биспецифическое антитело № 4	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 10
Биспецифическое антитело № 5	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 10

Пример 5. Исследования биспецифического антитела ATV:CLC на ксенотрансплантатах *in vivo*

Две HER2+ линии клеток человека использовали для оценки реакции биспецифического антитела ATV:CLC №1 на моделях подкожного ксенотрансплантата у мышей с иммунодефицитом (NOD/SCID). Все молекулы были приготовлены в одном и том же буфере для приготовления препарата (10 mM Na-ацетата, 6% сахарозы, pH 5,5) или PBS/солевом растворе, за исключением трастузумаба (Clinical Herceptin) и пертузумаба (Clinical Perjeta), которые были приобретены и приготовлены в соответствии с инструкциями и/или разбавлены дополнительно PBS или соевым раствором.

Таблица 13. Биспецифические молекулы к HER2

Патентная номенклатура	VH_D4 (сторона выступа)	VH_D2 (сторона впадины)	LC	Модификации Fc
Контрольные биспецифические антитела с общей легкой цепью (CLC) (Herceptarg)	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 19	Отсутствие TV
Контрольное биспецифическое антитело с общей легкой цепью (CLC) № 2	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Отсутствие TV
Биспецифическое антитело ATV:общая легкая цепь (CLC) № 1	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 19	Сторона выступа: TV35.23.4, цис-LALA
Биспецифическое антитело ATV:общая легкая цепь (CLC) № 2	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.23.4, цис-LALA
Биспецифическое антитело ATV:общая легкая цепь (CLC) № 3	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.23.4, цис-LALAPS, S239D Сторона впадины: I332E
Биспецифическое антитело ATV:общая легкая цепь (CLC) № 7	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.23.4, цис-LALAPS, S239D и I332E Сторона впадины: S239D и I332E

Для модели ксенотрансплантата (CDX), полученного из линии клеток рака молочной железы BT-474, самкам мышей NSG (NOD scid гамма) (в возрасте 6–7 недель) вводили подкожно в подмышечную область клетки BT-474, и лечение начинали через

шесть дней после инокуляции, когда размеры опухолей достигали 100-200 мм³. Мышей рандомизировали на группы лечения на основании среднего объема опухоли, n=11 мышей на группу. Комбинированное лечение трастузумабом и пертузумабом в дозе 40 + 40 мг/кг или биспецифическим антителом ATV:CLC № 1 в дозе 80 мг/кг проводили путем внутривенной инъекции (в/в). Объемы опухолей измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля.

В относительно чувствительной к трастузумабу модели ксенотрансплантата BT-474 биспецифическое антитело ATV:CLC №1 продемонстрировало эквивалентное ингибирование роста опухоли после однократного применения по сравнению с трастузумабом и пертузумабом, с полной регрессией опухолей для всей группы лечения через 21 день (фиг. 3А).

Для модели CDX желудочно-пищеводного соединения OE19 самкам мышей NOD/SCID (в возрасте 6–8 недель) подкожно вводили клетки OE19 в верхнюю область правого бока и лечение начинали через неделю после инокуляции, когда размеры опухолей достигал 100-200 мм³ в объеме. Мышей рандомизировали на группы лечения на основе метода попарного распределения/стратифицированного метода, с n=11 мышами на группу. Лечение комбинацией ATV:трастузумаб и ATV:пертузумаб в дозе 50 + 50 мг/кг или биспецифическим антителом ATV:CLC №1 в дозе 100 мг/кг проводили посредством внутривенной инъекции. Объемы опухолей измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля.

В модели ксенотрансплантата OE19, которая демонстрирует относительную устойчивость к комбинированному лечению трастузумабом и пертузумабом, биспецифическое антитело ATV:CLC № 1 и комбинация ATVcis-LALA:трастузумаб и ATVcis-LALA:пертузумаб демонстрировали значительную задержку роста опухоли по сравнению с контрольной группой (фиг. 3В). Все группы начинаются с n=11 мышей на группу. Числа на графике представляют количество животных, оставшихся в контрольной группе после того, как подгруппа животных достигла гуманной конечной точки. Одно животное найдено мертвым в группе комбинации ATV на 17 день без видимой причины. ATV:трастузумаб и ATV:пертузумаб представляют собой антитела трастузумаба и пертузумаба, содержащие модификацию Fc, которая связывается с TfR («TV») и мутациями cis-LALA. Эти результаты *in vivo* согласуются с данными об ингибировании роста *in vitro*, которые продемонстрировали повышенную эффективность и повышенный максимальный эффект ATV:HER2 (молекулы к HER2 с TV) на линии клеток OE19 по сравнению с молекулами к HER2, лишенными модификации TfR-связывающей Fc.

В последующем исследовании применения более низких доз для изучения эффекта

связывания TfR биспецифическое антитело ATV:CLC № 1 сравнивали с контрольным биспецифическим антителом CLC, которое содержало идентичные Fab, что и биспецифическое антитело № 1 ATV:CLC, но не имело модификации TfR-связывающей Fc. Для модели CDX рака молочной железы BT-474 самкам мышей NOD/SCID (возраст 6–8 недель) имплантировали гранулы эстрогена (0,36 мг, 17 β -эстрадиол, гранулы с высвобождением в течение 60 дней) за день до инокуляции опухоли. Затем клетки BT-474 вводили подкожно в жировую ткань молочной железы и лечение начинали через восемь дней после инокуляции, когда размеры опухолей достигали 100–200 мм³. Мышей рандомизировали на группы лечения на основе метода попарного распределения/стратифицированного метода, с n=11 мышами на группу. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля.

Однократная доза 20 мг/кг биспецифического антитела ATV:CLC №1, введенная внутривентриально, показала аналогичную задержку роста опухоли, что и контрольное биспецифическое антитело CLC (без связывания TfR) на чувствительной модели ксенотрансплантата BT-474 (фиг. 4A). Биспецифическое антитело ATV:CLC №1 продемонстрировало улучшенный ответ на более резистентной модели ксенотрансплантата OE19 при равных дозах, равных 20 мг/кг, и эквивалентный противоопухолевый ответ при дозе, в четыре раза меньшей (5 мг/кг), чем доза контрольного биспецифического антитела CLC (фиг. 4B).

В дополнительном промежуточном исследовании биспецифические антитела ATV:CLC №1 и №2 сравнивали в исследованиях многократных доз на ксенотрансплантатах. В модели BT-474 мышам (n=11 в каждой группе) вводили дозу каждые 1 неделю внутривентриально, т.е. мышам вводили одну дозу в неделю в течение 3 недель. Биспецифическое антитело ATV:CLC №1 и биспецифическое антитело ATV:CLC №2 показали одинаковое ингибирование и задержку роста опухоли (фиг. 5A). Кроме того, тем же группам вводили тукатиниб в сочетании с ежедневным пероральным приемом 50 мг/кг в течение 21 дня, но никаких дополнительных улучшений не наблюдали при использовании биспецифического антитела ATV:CLC № 1 или № 2.

Наконец, Fc-сконструированный вариант биспецифического антитела ATV:CLC №2, биспецифического антитела ATV:CLC №3 (содержащий дополнительные модификации Fc, например, P329S, I332E и S239D) также сравнивали с молекулами к HER2, не имеющими связывания с TfR, в исследовании применения многократных доз на ксенотрансплантате OE19. Мышам вводили дозу каждые 2 недели посредством внутривентриального введения, т.е. мышам вводили одну дозу каждые 2 недели в течение 6 недель. Биспецифическое антитело ATV:CLC №3 показало повышенную задержку роста

опухоли и повышенную выживаемость по сравнению с комбинацией трастузумаба и пертузумаба или контролем биспецифического антитела CLC (фиг. 5B). Все группы начинаются с n=11 мышей на группу. Числа на графике представляют количество животных, оставшихся в группе после того, как подгруппа животных достигла гуманной конечной точки.

Пример 6. Поглощение и распределение в головном мозге биспецифического антитела ATV:CLC

Мышам Tfr^{mu/hu} KI (см., например, международную публикацию WO 2018/152285) вводили внутривенно одну дозу 25 мг/кг контрольного биспецифического антитела CLC или биспецифического антитела ATV:CLC №3 (n=4/группа). Забор крови при жизни проводили через 30 минут и 6 часов, а через 1, 4, 7 и 10 дней после введения дозы проводили терминальный забор крови и отбирали и сразу замораживали головной мозг для оценки концентраций huIgG в плазме и лизате головного мозга с помощью ELISA.

Концентрации в плазме и головном мозге измеряли после введения однократной дозы контрольного биспецифического антитела CLC или биспецифического антитела ATV:CLC № 3 у Tfr^{mu/hu} KI мышей. Концентрации биспецифического антитела ATV:CLC №3 в головном мозге были примерно в 6,5 раз выше через 24 часа после введения дозы по сравнению с контрольным биспецифическим антителом CLC (фиг. 6). Это демонстрирует Tfr-опосредованную доставку молекул ATV в головной мозг. Аналогичным образом, в ходе исследования, биспецифическое антитело ATV:CLC № 2, № 3 и № 7 показало примерно в 4–5 раз более высокие концентрации в головном мозге через 24 часа и примерно в 2 раза более высокие концентрации в головном мозге через 4 дня после внутривенного введения.

Кроме того, была проведена иммуногистохимия введенных молекул в головном мозге. Одно свежее полушарие головного мозга на животное фиксировали погружением примерно на 24 часа при 4°C для иммуногистохимического анализа, а затем подвергали криопротекции в сахарозе и делали срезы на замораживающем микротоме. Корональные срезы головного мозга (40 мкм) отбирали для каждого животного и окрашивали путем инкубации в блокирующем буфере (1% BSA + 1x рыбий желатин + 0,5% Triton X-100 + 0,01% азид натрия в PBS) в течение трех часов при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали в течение ночи в буфере для разведения (1% BSA + 0,3% Triton X-100 + 0,01% азид натрия в PBS), содержащем первичные/вторичные антитела (NeuN, Abcam, ab177487 и ослиное антитело к huIgG, Jackson, 709-606-149) при 4°C, промывали три раза по 15 минут каждый в PBS с 0,3% Triton X-100 и инкубировали в течение трех часов в буфере для разведения, содержащем вторичные антитела (ослиные антикроличьи

антитела, Invitrogen, A21206) и DAPI (5 мкг/мл, Invitrogen, D1306) и промывали три раза по 15 минут каждый в PBS с 0,3% Triton X-100 перед заливкой и наложением покровных стекол с помощью Prolong Glass (Invitrogen, P36984). Микропрепараты визуализировали с помощью конфокального микроскопа Leica SP8 при 20-кратном увеличении, а сегментацию и визуализацию проводили с помощью Imaris.

Иммуногистохимия каркаса huIgG введенных молекул выявила широкое распространение биспецифического антитела ATV:CLC №3 в нормальном головном мозге, локализующегося в кровеносных сосудах и NeuN+ нейронах вместе с диффузным сигналом в паренхиме (фиг. 7A). Напротив, контрольное биспецифическое антитело CLC показало ограниченное проникновение или распространение в ткани головного мозга (фиг. 7B). Это согласуется со значительно более низкими концентрациями в головном мозге, наблюдаемыми для отличных от TV молекул к HER2, т.е. молекул без связывания Tfr. Аналогичные результаты, т.е. сосудистая и нейрональная/паренхиматозная локализация, наблюдались для биспецифического антитела ATV:CLC №2 и биспецифического антитела ATV:CLC №7.

Пример 7. ФК биспецифических антител ATV:CLC в плазме у яванских макак

Для оценки влияния модификаций Fc на системный клиренс, сравнивали варианты модификации Fc. Поскольку TV35.23.4 (т.е. CH3C.35.23.4) не обладает перекрестной реактивностью у яванского макака, т.е. не связывает Tfr яванского макака, использовали биспецифические ATV к HER2 с TV35.21 (см. CH3C.35.21 в таблице А выше) вместо TV35.23.4. Как показано в таблице 14 ниже, в этих молекулах используются те же Fab, что и в биспецифических антителах ATV:CLC № 2, № 3 и № 7, использованных в исследованиях на мышах, описанных выше.

Биспецифические антитела ATV:CLC №4, №5 и №6 сравнивали с клиническим одобренным герцептином (трастузумабом), и концентрации huIgG в сыворотке крови измеряли в различные моменты времени после однократного внутривенного введения дозы, равной 50 мг/кг, у самок яванских макак (n=3/группа).

Таблица 14. Биспецифические молекулы к HER2 для исследования на яванских макаках

	VH_D4 (сторона выступа)	VH_D2 (сторона впадины)	LC	Модификации Fc
Биспецифическое антитело ATV:CLC №4	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.21, цис-LALA
Биспецифическое антитело ATV:CLC №5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.21, цис-LALAPS, S239D Сторона впадины: I332E

Биспецифическое антитело ATV:CLC №6	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	Сторона выступа: TV35.21, цис-LALAPS, S239D и I332E Сторона впадины: S239D и I332E
-------------------------------------	---------------	--------------	---------------	---

Все молекулы ATV:HER2 продемонстрировали более быстрый клиренс из системного кровообращения по сравнению с герцептином (трастузумаб), как и ожидалось, благодаря TfR-опосредованному клиренсу (фиг. 8).

Пример 8. ADCC/ADCP биспецифических антител к HER2 на NK-клетках *in vitro*

Для оценки того, влияют ли различия в аффинности связывания Fc-гамма-рецепторов с различными Fc-мутантами на HER2-опосредованное уничтожение опухолевых клеток или TfR-опосредованное уничтожение клеток с помощью выделенных NK-клеток человека, был использован клеточный анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

NK-клетки выделяли из цельной крови и использовали для оценки активации человеческого FcγRIIIa. Кровь собирали в Trizma. Клетки выделяли в соответствии с протоколом обогащения NK-клеток человека RosetteSep (Stemcell 15065). Коктейль RosetteSep добавляли к образцам крови в пробирке SepMate и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. После инкубации образцы разводили равным объемом PBS (Gibco 10010-0310) и 10% FBS (бычья сыворотка Hyclone SH30080.03). Разбавленный образец затем добавляют в среду с градиентом плотности Lymphoprep (Stemcell 07801) и центрифугируют в течение 10 минут. Обогащенные клетки затем собирают и промывают 2 раза PBS. Наконец, к клеткам добавляют 20 нг/мл IL-21 и оставляют на ночь для применения на следующий день.

Было протестировано несколько линий клеток с различными уровнями экспрессии HER2 и TfR. Клетки SKBR3 (ATCC HTB-30) и CHO-KI+HumanTfR (Соглашение о сотрудничестве между ChemPartner и CRO) культивировали в среде RPMI (Life Technologies 61870-036) с добавлением 10% FBS (бычьей сыворотки Hyclone SH30080.03) и 1% пенициллина-стрептомицина (Life Technologies 15140-122) до экспоненциальной фазы, дважды промывали PBS и ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина.

Прозрачные 96-луночные необработанные планшеты с V-образным дном (Costar 3897) покрывали 25 мкл среды, содержащей 50000 клеток/лунка. Титры антител готовили в RPMI с добавлением 10% сыворотки FBS и добавляли по 25 мкл на лунку для опсонизации клеток, затем накрывали и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, 5% CO₂. Во время опсонизации антитела NK-клетки один раз промывали средой, содержащей RPMI и 10% FBS. Клетки подсчитывали и для определения плотности клеток

использовали соотношение Е:Т 25:1. После 30-минутной опсонизации НК-клетки добавляли в каждый планшет по 25 мкл на лунку и инкубировали в течение 4 часов. После инкубации планшетам давали уравновеситься до комнатной температуры и вращали их при $300 \times g$ в течение 5 минут. 50 мкл супернатанта переносили в белый 96-луночный планшет с прозрачным дном (Thermo 165306). В каждую лунку планшета, содержащую супернатант, добавляли 50 мкл аналитического реагента CytoTox 96[®]. Планшет накрывали для защиты от света и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Добавляли стоп-раствор и измеряли сигнал поглощения при 490 нм в планшет-ридере. Высвободившуюся ЛДГ в культуральных супернатантах измеряли с помощью 30-минутного сопряженного ферментативного анализа, который приводит к превращению соли тетразолия (йоднитротетразолий фиолетовый; INT) в красный формазановый продукт. Количество образовавшегося цвета пропорционально количеству лизированных клеток.

Интересно, что в этом анализе опухолевых клеток, экспрессирующих HER2, модификация цис-LALA привела лишь к небольшому сдвигу кривой вправо, что указывает на небольшое снижение активности, но наблюдался такой же максимальный эффект уничтожения клеток, как и для отличной от TV биспецифической молекулы к HER2, т.е. контрольного биспецифического антитела CLC №2 и трастузумаба (фиг. 9).

Не наблюдали уничтожения TfR-экспрессирующих клеток (HER2-) с цис-LALA или дополнительными мутациями Fc, что позволяет предположить, что эти молекулы не будут оказывать отрицательного воздействия на TfR-экспрессирующие клетки.

Репортерный анализ ADCP для измерения активации FcgRIIA также продемонстрировал, что биспецифическая молекула ATV:CLC № 2 и варианты Fc (биспецифические молекулы ATV:CLC № 3 и № 7) демонстрировали аналогичную активацию рецептора, что было выше, чем для трастузумаба, и немного меньше, чем для контрольного биспецифического антитела CLC № 2.

Пример 9. Анализ связывания FcgR биспецифическими антителами ATV:CLC

Аффинность связывания Fc-гамма-рецептора сконструированных антител к HER2 измеряли методом SPR с использованием прибора Biacore 8K. Биотинилированные рекомбинантные Fc-гамма-рецепторы захватывали на сенсорных чипах Biacore[™] Series SA с последующими инъекциями серийных 3-кратных разведений Fc-сконструированных антител к Her2 со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали с использованием пяти 60-секундных инъекций с возрастающими концентрациями антител с последующей 5-минутной диссоциацией. Для анализа кинетики использовали модель Ленгмюра 1:1 с одновременной аппроксимацией значений k_{on} и k_{off} .

Таблица 15. Аффинности связывания Fc-гамма-рецептора Fc-сконструированных антител к Her2

	Трастузумаб	Биспецифическое антитело ATV:CLC №4	Биспецифическое антитело ATV:CLC №5	Биспецифическое антитело ATV:CLC №6
FcgR2a	48 нМ	430 нМ	39 нМ	13 нМ
FcgR3a(V158)	890 нМ	3,2 мкМ	560 нМ	760 нМ

Повышенная аффинность к FcgR наблюдается у вариантов Fc, сконструированных с использованием S239D и I332E, т.е. биспецифических антител ATV:CLC №5 и №6, по сравнению с биспецифическим антителом ATV:CLC №4 и трастузумабом. Однако, если принять во внимание результаты анализов ADCC, описанные выше, это повышенная аффинность может применяться только тогда, когда антитела связаны с мишенью Fab, то есть HER2.

IX. Иллюстративные варианты осуществления

Иллюстративные варианты осуществления, представленные в соответствии с описанным в данном документе объектом изобретения, включают, помимо прочего, формулу изобретения и следующие варианты осуществления:

1. Выделенное антитело, содержащее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91,

при этом по меньшей мере одно из:

X₁ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₂ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой F;

X₃ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₁ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₂ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₃ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой S;

X₄ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;

X₅ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;

X₆ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой Q;

X₁ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой L;

X₂ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой G;

X₃ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой P; и

X₄ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой S.

2. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, в котором CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, где X₁ представляет собой N, K, M или H.

3. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, в котором CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q.

4. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, в котором CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₆ представляет собой R, H или T.

5. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, в котором CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой W, F, D, L или Y.

6. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, в котором CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

7. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

8. Выделенное антитело по варианту осуществления 1, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59.

9. Выделенное антитело по варианту осуществления 8, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

10. Выделенное антитело по варианту осуществления 9, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

11. Выделенное антитело по варианту осуществления 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность

SEQ ID NO:7.

12. Выделенное антитело по варианту осуществления 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

13. Выделенное антитело по варианту осуществления 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

14. Выделенное антитело по варианту осуществления 8, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3.

15. Выделенное антитело по варианту осуществления 8, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3.

16. Выделенное антитело, содержащее:

(a) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

17. Выделенное антитело по варианту осуществления 16, дополнительно содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11; и

(c) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

18. Выделенное антитело по варианту осуществления 16, дополнительно

содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; и

(c) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

19. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 16–18, в котором CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

20. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 16–18, в котором CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

21. Выделенное антитело по варианту осуществления 17, содержащее переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10.

22. Выделенное антитело по варианту осуществления 17, содержащее переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

23. Выделенное антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, содержащий:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящую из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

24. Выделенное антитело по варианту осуществления 23, в котором антигенсвязывающий сайт содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

25. Выделенное антитело по варианту осуществления 24, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1-3, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10.

26. Выделенное антитело по варианту осуществления 24, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3, и переменную область

легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

27. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 23–26, дополнительно содержащее второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

28. Выделенное антитело по варианту осуществления 27, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

29. Выделенное антитело по варианту осуществления 27 или 28, в котором второй антигенсвязывающий сайт дополнительно содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или 14.

30. Выделенное антитело по варианту осуществления 29, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10.

31. Выделенное антитело по варианту осуществления 29 или 30, в котором первый и второй антигенсвязывающие сайты содержат одинаковые последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

32. Выделенное антитело по варианту осуществления 31, содержащее CDR тяжелой и легкой цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 1.

33. Выделенное антитело, содержащее тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2.

34. Выделенное антитело, содержащее:

(a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2);

(b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека; и

(c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TtR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

35. Выделенное антитело по варианту осуществления 34, в котором первый полипептид Fc содержит модифицированный домен CH3, содержащий TtR-связывающий сайт.

36. Выделенное антитело по варианту осуществления 35, в котором модифицированный домен CH3 получен из домена CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

37. Выделенное антитело по варианту осуществления 35 или 36, в котором модифицированный домен CH3 содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или одиннадцать замен в наборе аминокислотных положений, включающем 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 415, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU.

38. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 35–37, в котором модифицированный домен CH3 содержит Glu, Leu, Ser, Val, Trp, Tyr или Gln в положении 380; Leu, Tyr, Phe, Trp, Met, Pro или Val в положении 384; Leu, Thr, His, Pro, Asn, Val или Phe в положении 386; Val, Pro, Ile или кислую аминокислоту в положении 387; Trp в положении 388; алифатическую аминокислоту, Gly, Ser, Thr или Asn в положении 389; Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Glu, Asn, Arg или Thr в положении 390; кислую аминокислоту, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro, Ile или His в положении 413; Glu, Ser, Asp,

Gly, Thr, Pro, Gln или Arg в положении 415; Thr, Arg, Asn или кислую аминокислоту в положении 416; и/или ароматическую аминокислоту His или Lys в положении 421 в соответствии с нумерацией EU.

39. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–38, в котором первый полипептид Fc, содержащий модификации, создающие TfR-связывающий сайт, связывается с апикальным доменом TfR.

40. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–39, в котором каждый из первого полипептида Fc и второго полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

41. Выделенное антитело по варианту осуществления 40, в котором первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

42. Выделенное антитело по варианту осуществления 40, в котором первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

43. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–42, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат модификации, которые снижают TfR-опосредованную эффекторную функцию.

44. Выделенное антитело по варианту осуществления 43, в котором модификации, снижающие эффекторную функцию, представляют собой замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU.

45. Выделенное антитело по варианту осуществления 44, в котором первый полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A.

46. Выделенное антитело по варианту осуществления 45, в котором первый полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU.

47. Выделенное антитело по варианту осуществления 46, в котором второй полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU.

48. Выделенное антитело по варианту осуществления 44, в котором второй полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A.

49. Выделенное антитело по варианту осуществления 48, в котором второй полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU.

50. Выделенное антитело по варианту осуществления 49, в котором первый

полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU.

51. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–50, в котором шарнирная область или ее часть связана с N-концом первого полипептида Fc и/или второго полипептида Fc.

52. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–51, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:71–86 и 98–100.

53. Выделенное антитело по варианту осуществления 52, в котором первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:71–73, 85 и 99–100.

54. Выделенное антитело по варианту осуществления 52, в котором первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74–84, 86 и 98.

55. Выделенное антитело по варианту осуществления 34, в котором:

первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1–3 и 60–70;

первый полипептид Fc, который содержит модификации, создающие TfR-связывающий сайт, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74–84, 86 и 98; и

полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

56. Выделенное антитело по варианту осуществления 55, дополнительно содержащее второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

57. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–56, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU.

58. Выделенное антитело по варианту осуществления 57, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc, независимо содержащие замену S239D и/или

I332E, способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию.

59. Выделенное антитело по варианту осуществления 57 или 58, в котором:

- (a) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (b) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (d) второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (f) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (g) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (h) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (i) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (j) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (k) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (l) второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;
- (m) первый полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;
- (n) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU; или
- (o) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU.

60. Выделенное антитело по варианту осуществления 59, в котором:

- (a) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(d) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU.

61. Выделенное антитело по варианту осуществления 60, в котором:

(a) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(d) первый полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU, а второй полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332.

62. Выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 34–61, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи.

63. Выделенное антитело по варианту осуществления 62, содержащее тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2.

64. Выделенное антитело по варианту осуществления 62, в котором первая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и Fc, выбранные из комбинаций в таблице 3, а

вторая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и F_c , выбранные из комбинаций в таблице 4.

65. Выделенное антитело по варианту осуществления 62, в котором первая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и F_c , выбранные из комбинаций в таблице 5, а вторая тяжелая цепь содержит последовательности V_H и F_c , выбранные из комбинаций в таблице 6.

66. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 1–65 и фармацевтически приемлемый носитель.

67. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую выделенное антитело по любому из вариантов осуществления 1–65.

68. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 67.

69. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 67 или вектор по варианту осуществления 68.

70. Способ лечения злокачественного новообразования или лечения метастазов в головном мозге при злокачественном новообразовании у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из вариантов осуществления 1–65 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 66.

71. Способ по варианту осуществления 70, в котором выделенное антитело применяют в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией.

72. Способ по варианту осуществления 70 или 71, в котором злокачественное новообразование представляет собой метастатическое злокачественное новообразование.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 70–72, в котором злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 70–73, в котором злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительное злокачественное новообразование.

Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения. Последовательности под порядковыми номерами, процитированными в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

Таблица 1. Комбинации CDR

Комбинация, №	HC1_D4, CDR1 SEQ ID NO	HC1_D4 CDR2 SEQ ID NO	HC1_D4 CDR3 SEQ ID NO	HC2_D2 CDR1 SEQ ID NO	HC2_D2 CDR2 SEQ ID NO	HC2_D2 CDR3 SEQ ID NO	LC CDR1 SEQ ID NO	LC CDR2 SEQ ID NO	LC CDR3 SEQ ID NO
A	16	17	18	4	6	7	11	12	13
B	16	17	18	4	5	8	11	12	13
C	16	17	18	4	6	8	11	12	13
D	16	17	18	4	6	7	11	12	14
E	16	17	18	4	5	8	11	12	14
F	16	17	18	4	6	8	11	12	14
G	16	17	18	49	5	7	11	12	13
H	16	17	18	50	5	7	11	12	13
I	16	17	18	51	5	7	11	12	13
J	16	17	18	52	5	7	11	12	13
K	16	17	18	4	53	7	11	12	13
L	16	17	18	4	54	7	11	12	13
M	16	17	18	4	55	7	11	12	13
N	16	17	18	4	5	56	11	12	13
O	16	17	18	4	5	57	11	12	13
P	16	17	18	4	5	58	11	12	13
Q	16	17	18	4	5	59	11	12	13
R	16	17	18	49	5	7	11	12	14
S	16	17	18	50	5	7	11	12	14
T	16	17	18	51	5	7	11	12	14
U	16	17	18	52	5	7	11	12	14
V	16	17	18	4	53	7	11	12	14
W	16	17	18	4	54	7	11	12	14
X	16	17	18	4	55	7	11	12	14
Y	16	17	18	4	5	56	11	12	14
Z	16	17	18	4	5	57	11	12	14
AB	16	17	18	4	5	58	11	12	14
AC	16	17	18	4	5	59	11	12	14

Таблица 2. Комбинации тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC)

Комбинация, №	HC1_D4, SEQ ID NO	HC2_D2, SEQ ID NO	LC, SEQ ID NO
A	37	25	9
B	31	30	9
C	31	29	9
D	38	30	9
E	32	30	9
F	32	29	9
G	39	30	9
H	37	26	9
I	31	34	9
J	31	33	9
K	38	34	9
L	32	34	9
M	32	33	9
N	39	34	9
O	37	27	9
P	31	36	9
Q	31	35	9
R	38	36	9
S	32	36	9
T	32	35	9
U	39	46	9
V	37	25	10

W	31	30	10
X	31	29	10
Y	38	30	10
Z	32	30	10
AA	32	29	10
AB	39	30	10
AC	37	26	10
AD	31	34	10
AE	31	33	10
AF	38	34	10
AG	32	34	10
AH	32	33	10
AI	39	34	10
AJ	37	27	10
AK	31	36	10
AL	31	35	10
AM	38	36	10
AN	32	36	10
AO	32	35	10
AP	39	46	10
AQ	20	24	19
AR	21	24	19
AS	22	24	19
AT	23	24	19

Таблица 3. Комбинации HC_D2 V_H и Fc (впадина)

Комбинация, №	V _H D2 SEQ ID NO	Fc, SEQ ID NO
A	1	71
B	2	71
C	3	71
D	1	72
E	2	72
F	3	72
G	1	73
H	2	73
I	3	73
J	1	85
K	2	85
L	3	85

Таблица 4. Комбинации HC_D4 V_H и Fc (выступ)

Комбинация, №	V _H D4 SEQ ID NO	Fc, SEQ ID NO
A	15	86
B	15	74
C	15	75
D	15	76
E	15	77
F	15	78
G	15	79
H	15	80
I	15	81
J	15	82
K	15	83
L	15	84

Таблица 5. Комбинации HC_D2 V_H и Fc (выступ)

Комбинация, №	V _H D2 SEQ ID NO	Fc, SEQ ID NO
A	1	86
B	1	74
C	1	75
D	1	76
E	1	77
F	1	78
G	1	79
H	1	80
I	1	81
J	1	82
K	1	83
L	1	84
M	2	86
N	2	74
O	2	75
P	2	76
Q	2	77
R	2	78
S	2	79
T	2	80
U	2	81
V	2	82
W	2	83
X	2	84
Y	2	86
Z	2	74
AA	2	75
AB	3	76
AC	3	77
AD	3	78
AE	3	79
AF	3	80
AG	3	81
AH	3	82
AI	3	83
AJ	3	84

Таблица 6. Комбинации HC_D4 V_H и Fc (впадина)

Комбинация, №	V _H D4 SEQ ID NO	Fc, SEQ ID NO
A	15	71
B	15	72
C	15	73
D	15	85

Неформальный перечень последовательностей

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGT LVTVSS	Анти-HER2_D2_VH_v1
2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGT LVTVSS	Анти-HER2_D2_VH_v2
3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGT LVTVSS	Анти-HER2_D2_VH_v3
4	GFTFTDYTMD	Анти-HER2_D2_CDR-H1
5	DVNPNSGGSIYNQRFKG	Анти-HER2_D2_CDR-H2
6	DVNPNSGQSIYNQRFKG	Анти-HER2_D2_CDR-H2.1
7	ARNLGPSFYFDY	Анти-HER2_D2_CDR-H3
8	ARNLGPLFYFDY	Анти-HER2_D2_CDR-H3.1
9	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQFYTPPTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_легкая цепь_v1
10	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_легкая цепь_v2
11	RASQDVNTAVA	Анти-HER2_CDR-L1
12	SASFLYS	Анти-HER2_CDR-L2
13	QQFYTPPT	Анти-HER2_CDR-L3.1
14	QQYYTPPT	Анти-HER2_CDR-L3.2
15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	Анти-HER2_D4_VH
16	GFNIKDTYIH	Анти-HER2_D4_CDR-H1
17	RIYPTNGYTRYADSVKG	Анти-HER2_D4_CDR-H2
18	RWGGDGFYAMDY	Анти-HER2_D4_CDR-H3
19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFRYTGVPSPRFSGRSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_легкая цепь_v3

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPSSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь v1
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь v2
22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь v3
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь v4

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFNDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIVNRRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v1
25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v2
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v3
27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v4

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v5
29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPPEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v5
30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPPEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v6
31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v6

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQGGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v7
33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v7
34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v8
35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v9

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTKISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v10
37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v8
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v9
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v10

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPEEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v11
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPEEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v12
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_v13
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v11

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW SNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v12
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW SNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v13
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v14
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v15

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGQSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPLFYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_v16
49	GFNFTDYTMD	Анти-HER2_CDR-H1.1
50	GFKFTDYTMD	Анти-HER2_CDR-H1.2
51	GFMFTDYTMD	Анти-HER2_CDR-H1.3
52	GFHFTDYTMD	Анти-HER2_CDR-H1.4
53	DVNPNSGGSIYNRRFKG	Анти-HER2_CDR-H2.2
54	DVNPNSGGSIYNHRFKG	Анти-HER2_CDR-H2.3
55	DVNPNSGGSIYNTRFKG	Анти-HER2_CDR-H2.4
56	ARNLGPWFYFDY	Анти-HER2_CDR-H3.2
57	ARNLGPFYFDY	Анти-HER2_CDR-H3.3
58	ARNLGPDFYFDY	Анти-HER2_CDR-H3.4
59	ARNLGPYFYFDY	Анти-HER2_CDR-H3.5
60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v4
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFKFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v5
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFMFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v6
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFHFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v7
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNRRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v8
65	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNHRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v9
66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNTRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v10

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPWFYFDYWGGQGLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v11
68	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFFYFDYWGGQGLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v12
69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPDFYFDYWGGQGLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v13
70	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFTDYTMDWVR QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPYFYFDYWGGQGLV TVSS	Анти-HER2_D2_VH_v4
71	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями по типу «впадина».hD
72	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями по типу «впадина».hE
73	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями по типу «впадина».hDE
74	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA и kD
75	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA и kE
76	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA и kDE

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
77	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA и PG
78	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA и PS
79	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PG и kD
80	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PS и kD
81	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PG и kE
82	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAP E EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PS и kE
83	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PG и kDE
84	APEAAGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAP E EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с выступом, LALA, PS и kDE
85	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями по типу «впадина»

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
86	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями по типу «выступ» и LALA
87	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_D4_легкая цепь_контроль
88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQXYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_легкая цепь_консенсусная
89	GFX ₁ X ₂ X ₃ DYTMD	Анти-HER2_CDR1_консенсусная
90	DVX ₁ PX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ SIYNX ₆ RFKG	Анти-HER2_CDR2_консенсусная
91	ARNX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ FYFDY	Анти-HER2_CDR3_консенсусная
92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Анти-HER2_D2_тяжелая цепь_контроль
93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Анти-HER2_D4_тяжелая цепь_контроль

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
94	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Анти-HER2_D2_легкая цепь_контроль
95	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc человека дикого типа
96	EPKSCDKTHTCPPCP	Шарнирная область IgG1 человека
97	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4
98	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутацией по типу «выступ»
99	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTWSNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями по типу «впадина»
100	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTWSNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями по типу «впадина» и LALA
101	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2
102	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутацией по типу «выступ»

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
103	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTIEWANYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями по типу «выступ» и LALA
104	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTIEWANYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями по типу «впадина»
105	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTIEWANYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями по типу «впадина» и LALA
106	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1
107	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутацией по типу «выступ»
108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGYAMDYWGQGLVTVSS	Анти-HER2_D4_VH_v1
109	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIVNRRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFFYFDYWGQGLVTVSS	Анти-HER2_D2_VH_v4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, содержащее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91,

при этом по меньшей мере одно из:

X₁ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₂ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой F;

X₃ в SEQ ID NO: 89 не представляет собой T;

X₁ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₂ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой N;

X₃ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой S;

X₄ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;

X₅ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой G;

X₆ в SEQ ID NO: 90 не представляет собой Q;

X₁ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой L;

X₂ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой G;

X₃ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой P; и

X₄ в SEQ ID NO: 91 не представляет собой S.

2. Выделенное антитело по п. 1, в котором CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, где X₁ представляет собой N, K, M или H.

3. Выделенное антитело по п. 1, в котором CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q.

4. Выделенное антитело по п. 1, в котором CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₆ представляет собой R, H или T.

5. Выделенное антитело по п. 1, в котором CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой W, F, D, L или Y.

6. Выделенное антитело по п. 1, в котором CDR3 тяжелой цепи включает

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

7. Выделенное антитело по п. 1, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, где X₅ представляет собой Q; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, где X₄ представляет собой L.

8. Выделенное антитело по п. 1, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59.

9. Выделенное антитело по п. 8, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

10. Выделенное антитело по п. 9, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

11. Выделенное антитело по п. 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

12. Выделенное антитело по п. 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

13. Выделенное антитело по п. 10, содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(а) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и

(с) CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность

SEQ ID NO:8.

14. Выделенное антитело по п. 8, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1–3.

15. Выделенное антитело по п. 8, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1–3.

16. Выделенное антитело, содержащее:

(a) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

17. Выделенное антитело по п. 16, дополнительно содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11; и

(c) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

18. Выделенное антитело по п. 16, дополнительно содержащее одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(b) CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; и

(c) CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

19. Выделенное антитело по п. 16, в котором CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

20. Выделенное антитело по п. 16, в котором CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

21. Выделенное антитело по п. 17, содержащее вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10.

22. Выделенное антитело по п. 17, содержащее вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9–10.

23. Выделенное антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, содержащий:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящую из SEQ ID NO:4

и 49–52, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и 49–52;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:5–6 и 53–55; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящую из SEQ ID NO:7–8 и 56–59, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–8 и 56–59;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

24. Выделенное антитело по п. 23, в котором антигенсвязывающий сайт содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6, или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6;

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;

(d) CDR1 легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или

имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(e) CDR2 легкой цепи, имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(f) CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

25. Выделенное антитело по п. 24, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1-3, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9-10.

26. Выделенное антитело по п. 24, в котором антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1-3 и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:9-10.

27. Выделенное антитело по п. 23, дополнительно содержащее второй антигенсвязывающий сайт, содержащий одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

28. Выделенное антитело по п. 27, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

29. Выделенное антитело по п. 27, в котором второй антигенсвязывающий сайт

дополнительно содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или 14.

30. Выделенное антитело по п. 29, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:9–10.

31. Выделенное антитело по п. 29, в котором первый и второй антигенсвязывающие сайты содержат одинаковые последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

32. Выделенное антитело по п. 31, содержащее CDR тяжелой и легкой цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 1.

33. Выделенное антитело, содержащее тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2.

34. Выделенное антитело, содержащее:

(a) первый антигенсвязывающий сайт для субдомена IV рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2);

(b) второй антигенсвязывающий сайт для субдомена II HER2 человека; и

(c) модифицированный димер полипептида Fc, содержащий первый полипептид Fc, который содержит модификации, которые создают TfR-связывающий сайт,

при этом последовательность полипептида легкой цепи в первом антигенсвязывающем сайте идентична последовательности полипептида легкой цепи во втором антигенсвязывающем сайте.

35. Выделенное антитело по п. 34, в котором первый полипептид Fc содержит модифицированный домен CH3, содержащий TfR-связывающий сайт.

36. Выделенное антитело по п. 35, в котором модифицированный домен CH3 получен из домена CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

37. Выделенное антитело по п. 35, в котором модифицированный домен CH3

содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или одиннадцать замен в наборе аминокислотных положений, включающем 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 415, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU.

38. Выделенное антитело по п. 35, в котором модифицированный домен CH3 содержит Glu, Leu, Ser, Val, Trp, Tyr или Gln в положении 380; Leu, Tyr, Phe, Trp, Met, Pro или Val в положении 384; Leu, Thr, His, Pro, Asn, Val или Phe в положении 386; Val, Pro, Ile или кислую аминокислоту в положении 387; Trp в положении 388; алифатическую аминокислоту, Gly, Ser, Thr или Asn в положении 389; Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Glu, Asn, Arg или Thr в положении 390; кислую аминокислоту, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro, Ile или His в положении 413; Glu, Ser, Asp, Gly, Thr, Pro, Gln или Arg в положении 415; Thr, Arg, Asn или кислую аминокислоту в положении 416; и/или ароматическую аминокислоту His или Lys в положении 421 в соответствии с нумерацией EU.

39. Выделенное антитело по п. 34, в котором первый полипептид Fc, содержащий модификации, создающие TfR-связывающий сайт, связывается с апикальным доменом TfR.

40. Выделенное антитело по п. 34, в котором каждый из первого полипептида Fc и второго полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

41. Выделенное антитело по п. 40, в котором первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

42. Выделенное антитело по п. 40, в котором первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

43. Выделенное антитело по п. 34, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат модификации, которые снижают TfR-опосредованную эффекторную функцию.

44. Выделенное антитело по п. 43, в котором модификации, снижающие эффекторную функцию, представляют собой замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU.

45. Выделенное антитело по п. 44, в котором первый полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A.

46. Выделенное антитело по п. 45, в котором первый полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU.

47. Выделенное антитело по п. 46, в котором второй полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU.

48. Выделенное антитело по п. 44, в котором второй полипептид Fc специфически связывается с TfR и содержит замены L234A и L235A.

49. Выделенное антитело по п. 48, в котором второй полипептид Fc дополнительно содержит замену P329G или P329S в соответствии с нумерацией EU.

50. Выделенное антитело по п. 49, в котором первый полипептид Fc содержит Leu в положениях 234 и 235 и пролин в положении 329 в соответствии с нумерацией EU.

51. Выделенное антитело по п. 34, в котором шарнирная область или ее часть связана с N-концом первого полипептида Fc и/или второго полипептида Fc.

52. Выделенное антитело по п. 34, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–86 и 98–100.

53. Выделенное антитело по п. 52, в котором первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

54. Выделенное антитело по п. 52, в котором первый полипептид Fc или второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74–84, 86 и 98.

55. Выделенное антитело по п. 34, в котором:

первый антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

второй антигенсвязывающий сайт включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1–3 и 60–70;

первый полипептид Fc, который содержит модификации, создающие TfR-связывающий сайт, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74–84, 86 и 98; и

полипептидная последовательность легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

56. Выделенное антитело по п. 55, дополнительно содержащее второй полипептид Fc, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71–73, 85 и 99–100.

57. Выделенное антитело по п. 34, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc независимо содержат замену S239D и/или I332E в соответствии с нумерацией EU.

58. Выделенное антитело по п. 57, в котором первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc, независимо содержащие замену S239D и/или I332E, способны усиливать HER2-опосредованную эффекторную функцию.

59. Выделенное антитело по п. 57, в котором:

(a) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(d) второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(g) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(h) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(i) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;

(j) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;

(k) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;

(l) второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU;

(m) первый полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(n) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(o) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU.

60. Выделенное антитело по п. 59, в котором:

(a) первый полипептид Fc содержит замену I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(d) второй полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E в соответствии с нумерацией EU.

61. Выделенное антитело по п. 60, в котором:

(a) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(b) первый полипептид Fc содержит замену S239D и I332E, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332 в соответствии с нумерацией EU;

(c) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(d) первый полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU;

(e) первый полипептид Fc содержит замену S239D и изолейцин в положении 332, а второй полипептид Fc содержит замену S239D и I332E в соответствии с нумерацией EU; или

(f) первый полипептид Fc содержит замену I332E и серин в положении 239 в соответствии с нумерацией EU, а второй полипептид Fc содержит серин в положении 239 и изолейцин в положении 332.

62. Выделенное антитело по п. 34, содержащее две тяжелые цепи и две легкие

цепи.

63. Выделенное антитело по п. 62, содержащее тяжелые и легкие цепи, выбранные из комбинаций, перечисленных в таблице 2.

64. Выделенное антитело по п. 62, в котором первая тяжелая цепь содержит последовательность V_H и C_H , выбранную из комбинаций в таблице 3, а вторая тяжелая цепь содержит последовательность V_H и C_H , выбранную из комбинаций в таблице 4.

65. Выделенное антитело по п. 62, в котором первая тяжелая цепь содержит последовательность V_H и C_H , выбранную из комбинаций в таблице 5, а вторая тяжелая цепь содержит последовательность V_H и C_H , выбранную из комбинаций в таблице 6.

66. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

67. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую выделенное антитело по п. 1.

68. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 67.

69. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 67 или вектор по п. 68.

70. Способ лечения злокачественного новообразования или лечения метастазов в головном мозге при злокачественном новообразовании у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по п. 1 или фармацевтической композиции по п. 66.

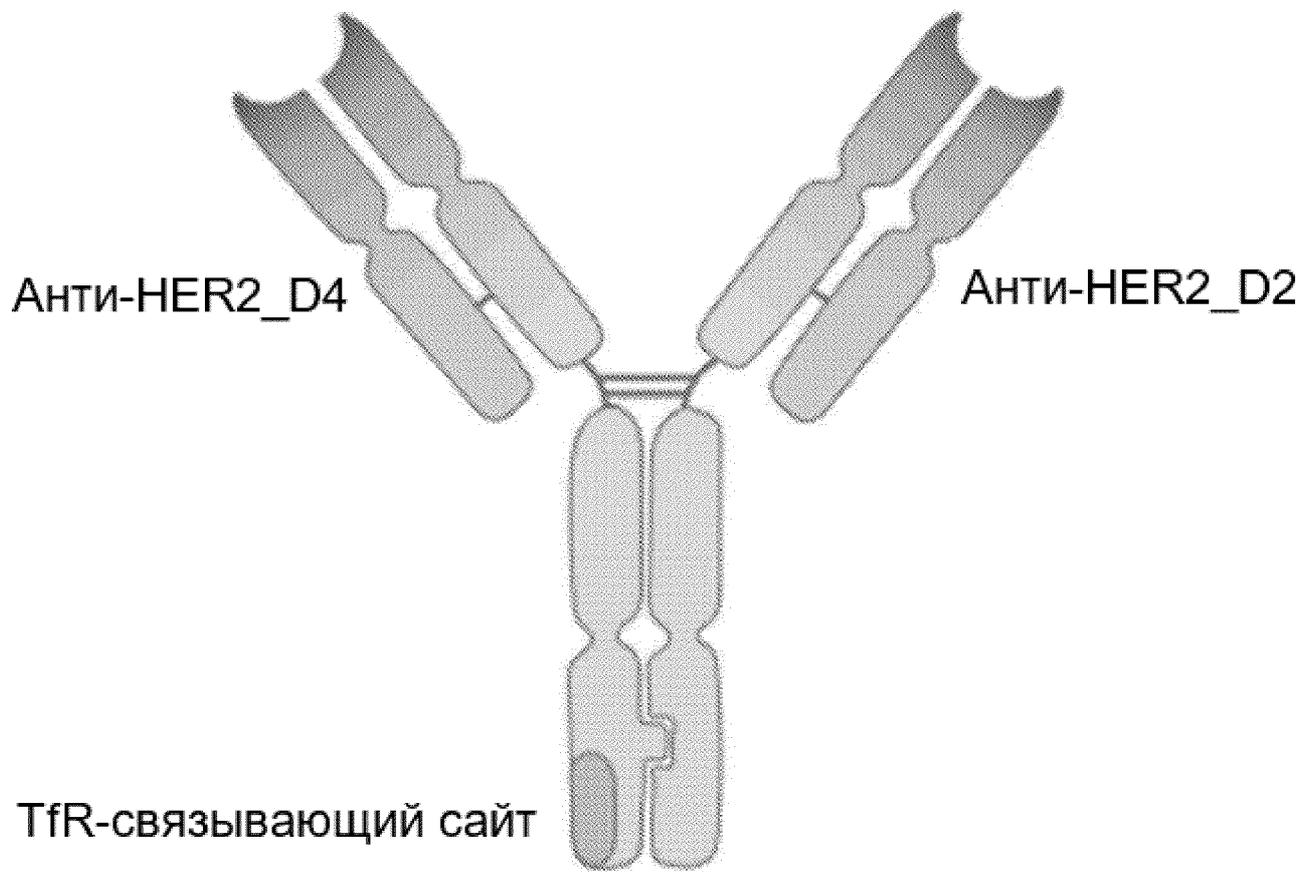
71. Способ по п. 70, в котором выделенное антитело вводят в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией.

72. Способ по п. 70, в котором злокачественное новообразование представляет собой метастатическое злокачественное новообразование.

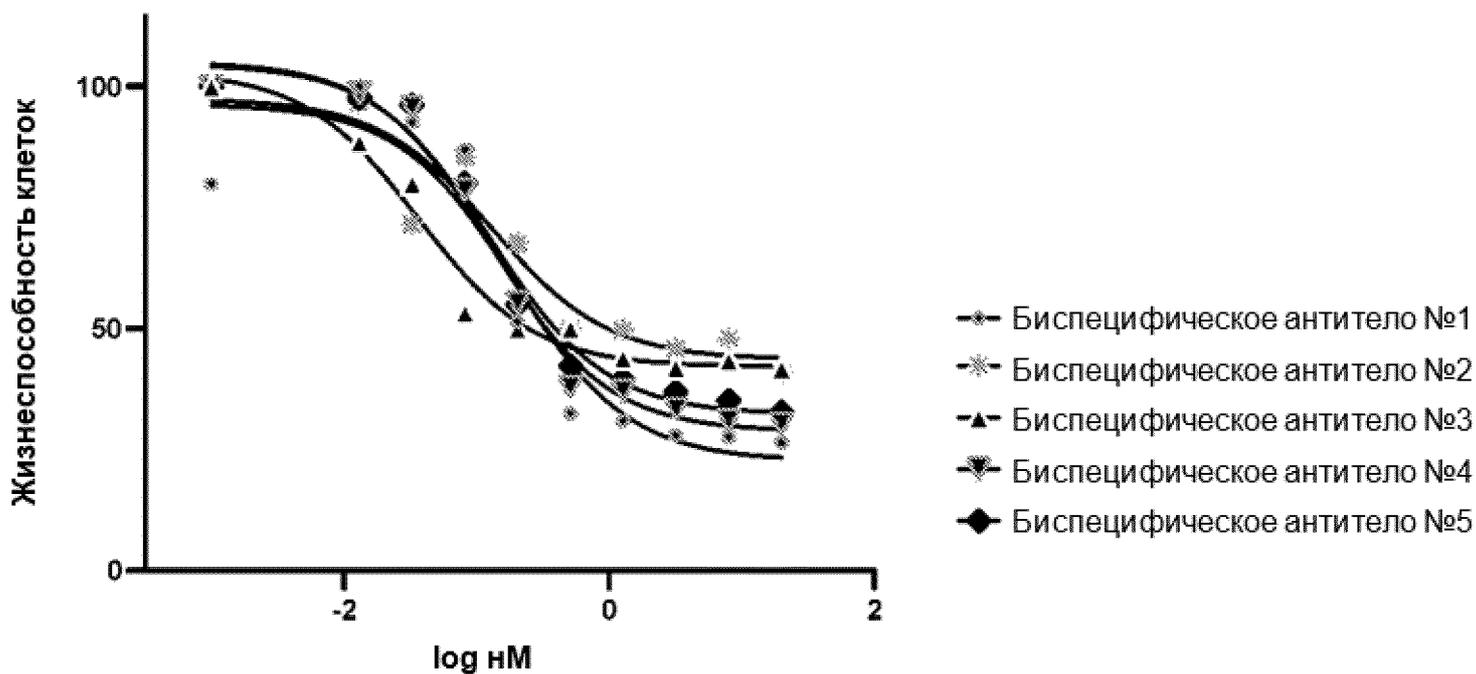
73. Способ по п. 70, в котором злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы.

74. Способ по п. 70, в котором злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительное злокачественное новообразование.

ФИГ. 1



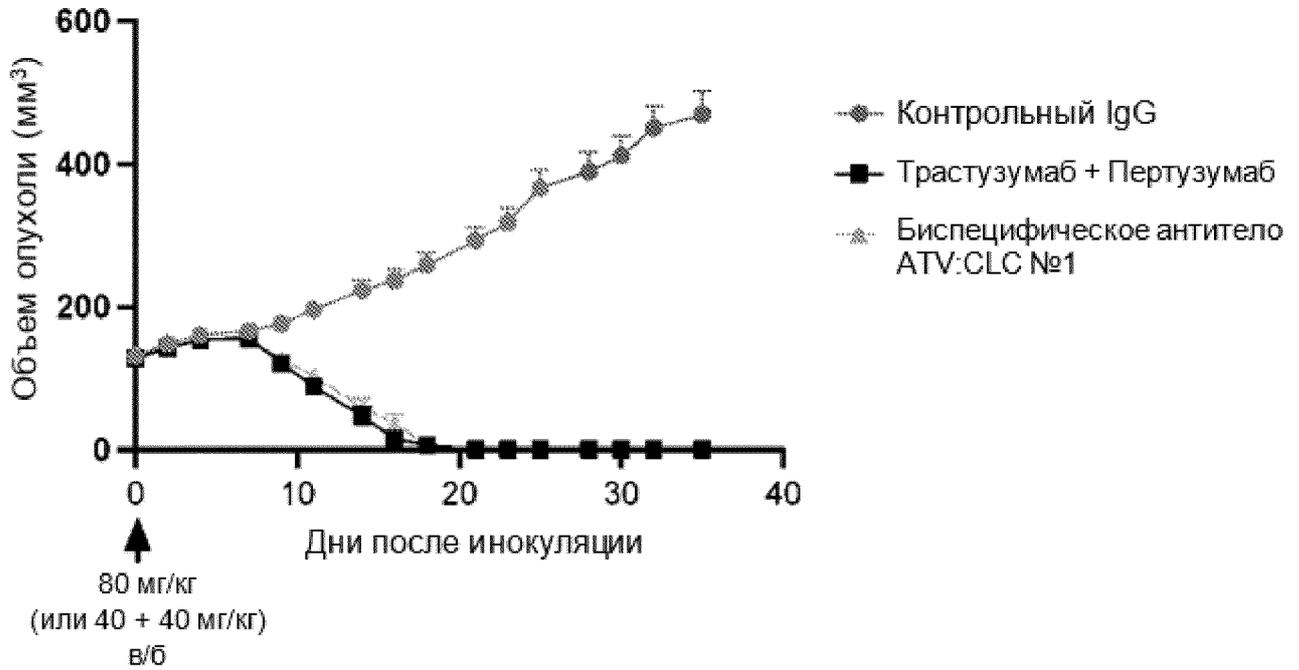
ФИГ. 2



	Биспецифическое антитело №1 (контроль)	Биспецифическое антитело №2	Биспецифическое антитело №3	Биспецифическое антитело №4	Биспецифическое антитело №5
Макс. % ингибирования роста	77,4	56,4	57,9	71,3	67,8
IC50 (нМ)	0,19	0,13	0,037	0,13	0,13

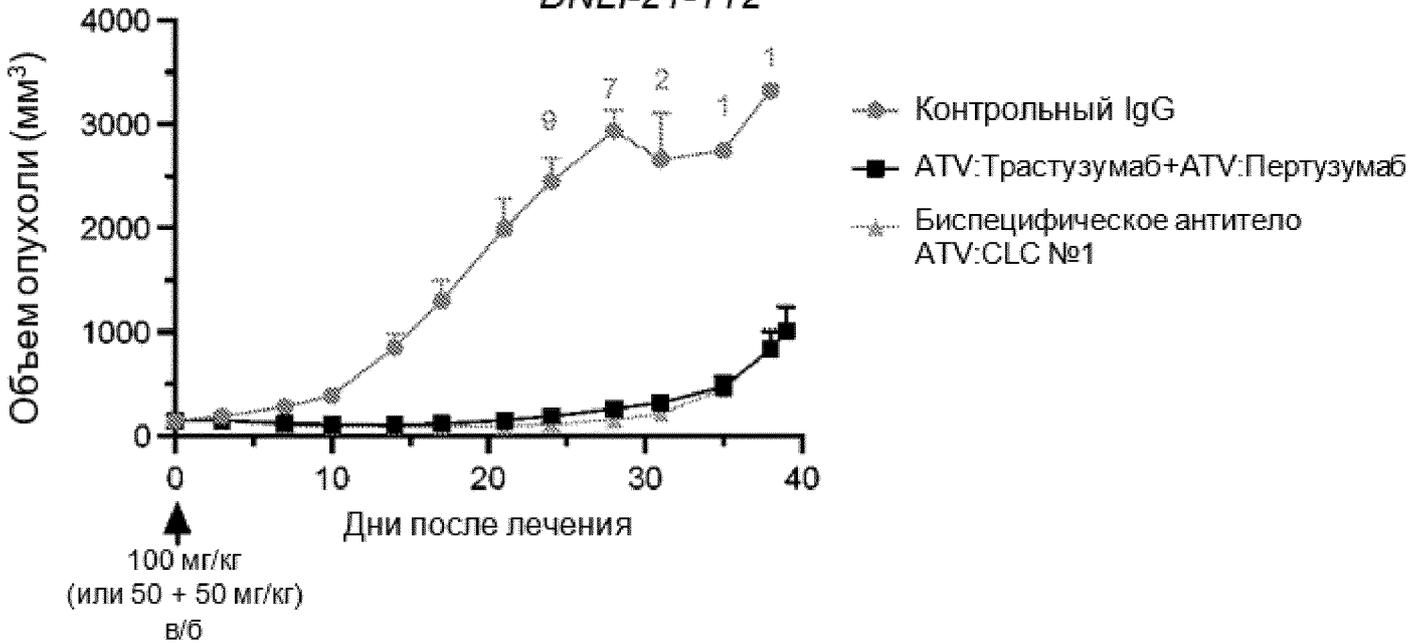
ФИГ. 3А

BT-474, NSG, п/к в подмышечную область



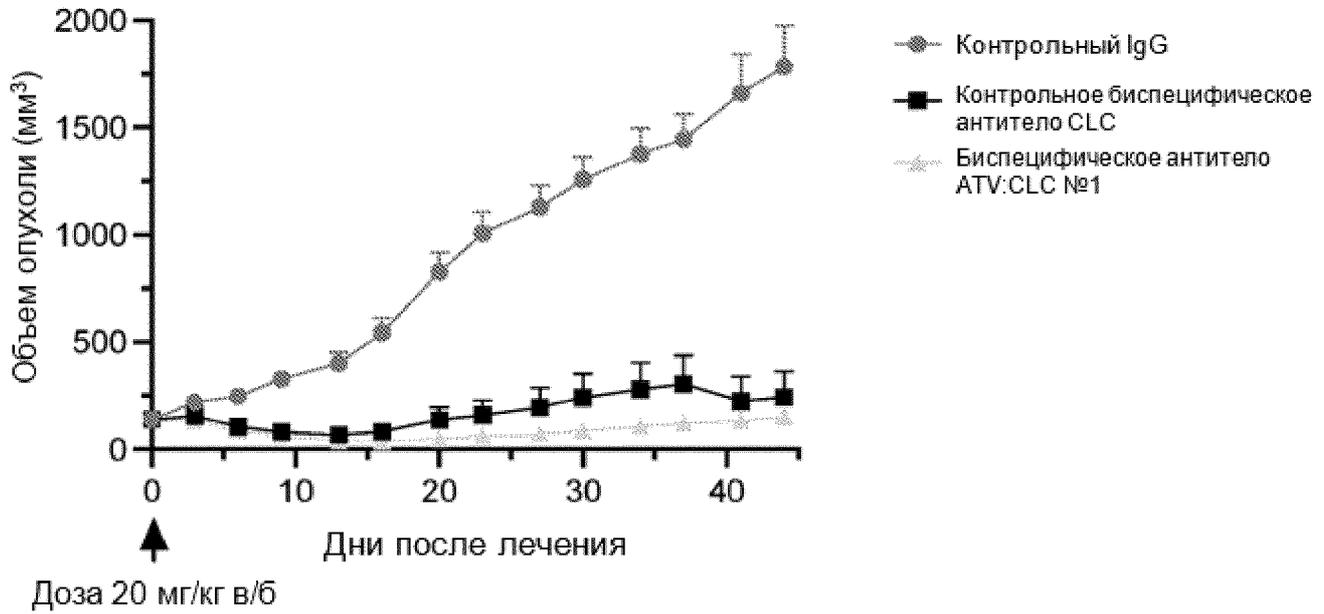
ФИГ. 3В

Средний объем опухоли (мм³)
OE19, NOD/SCID, п/к в область бока
DNLI-21-112



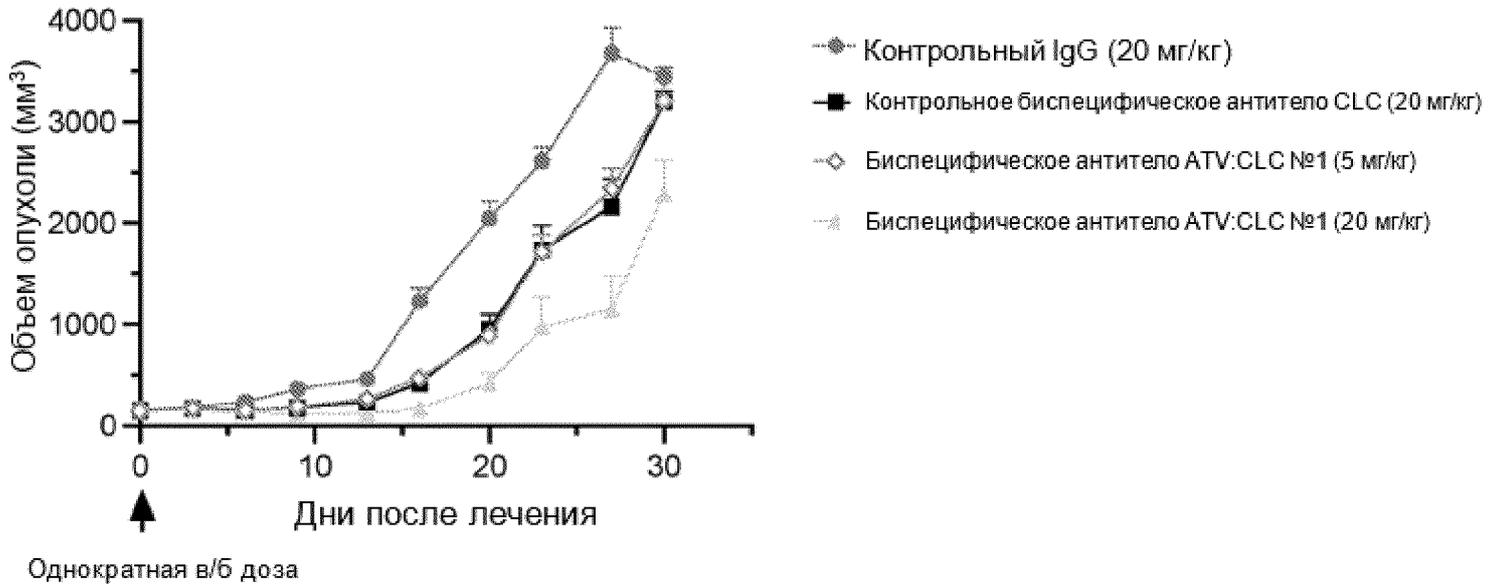
ФИГ. 4А

ортопический (MFP) BT-474, NOD/SCID

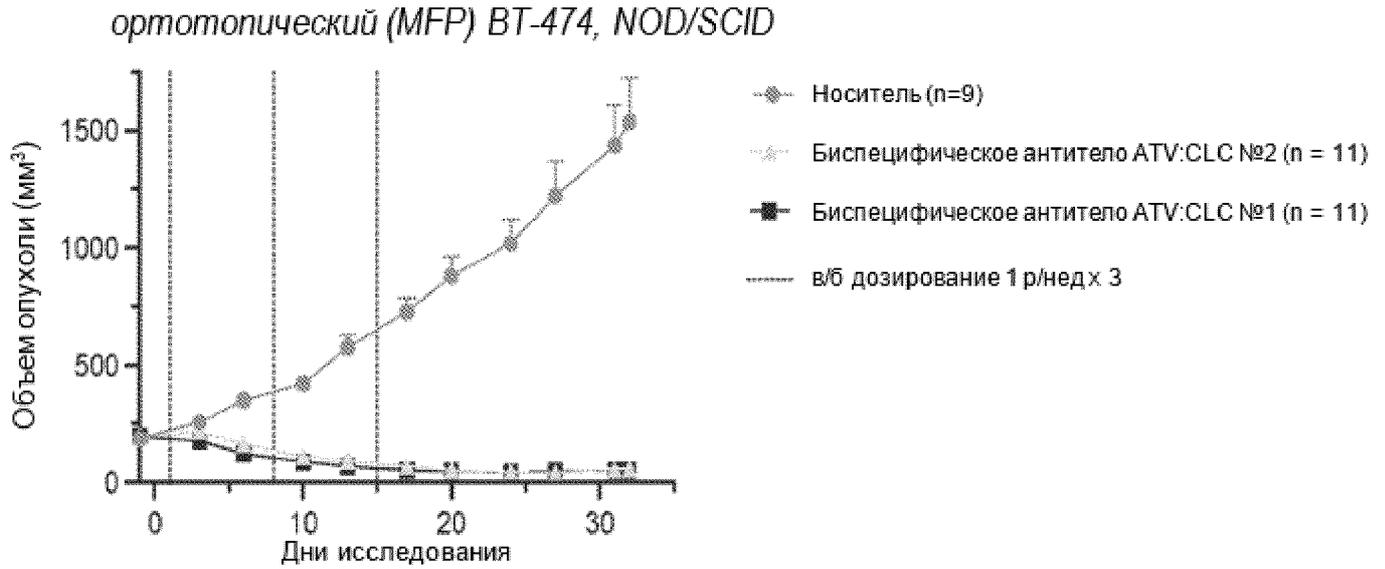


ФИГ. 4В

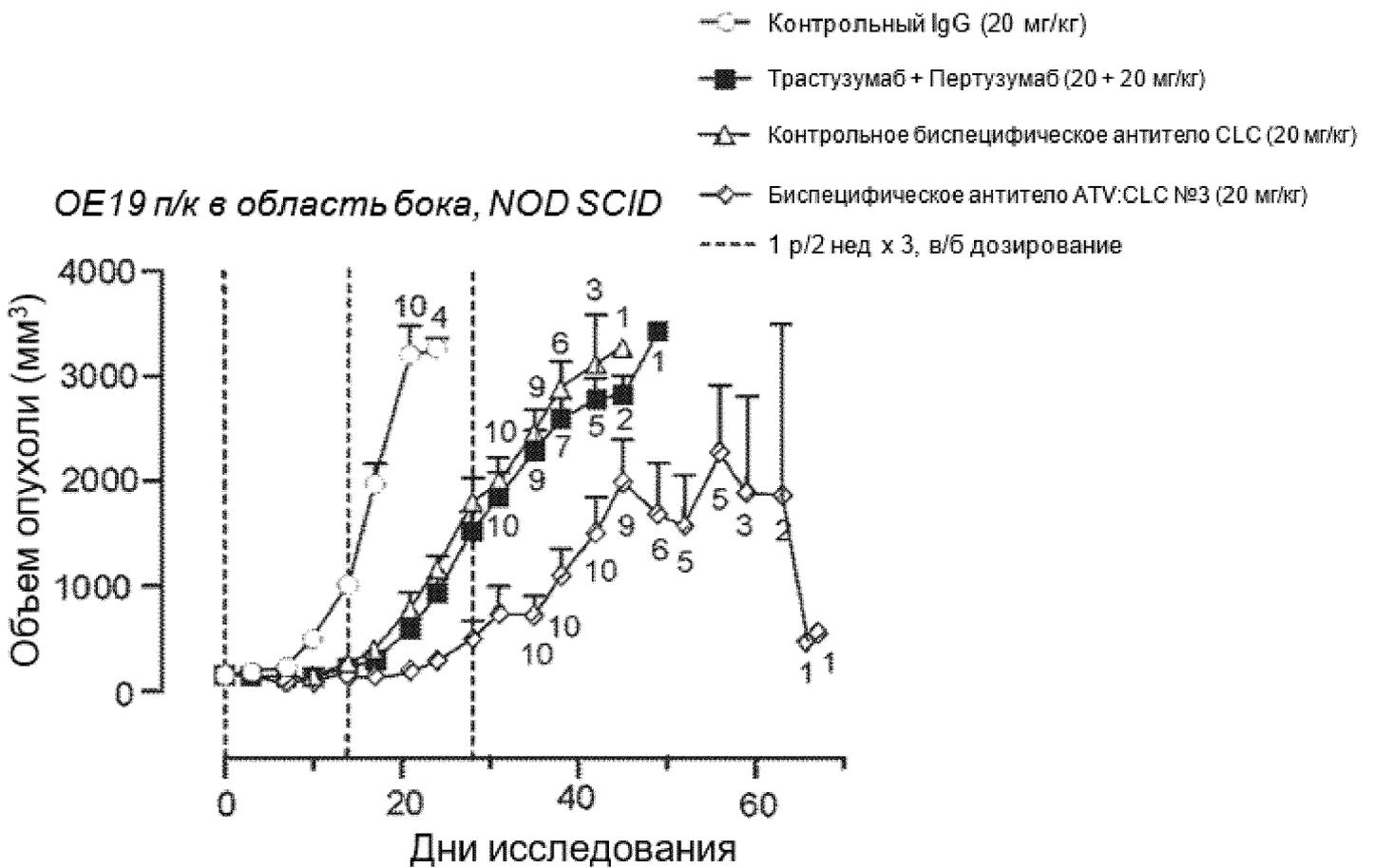
OE19, NOD/SCID, п/к в область бока



ФИГ. 5А

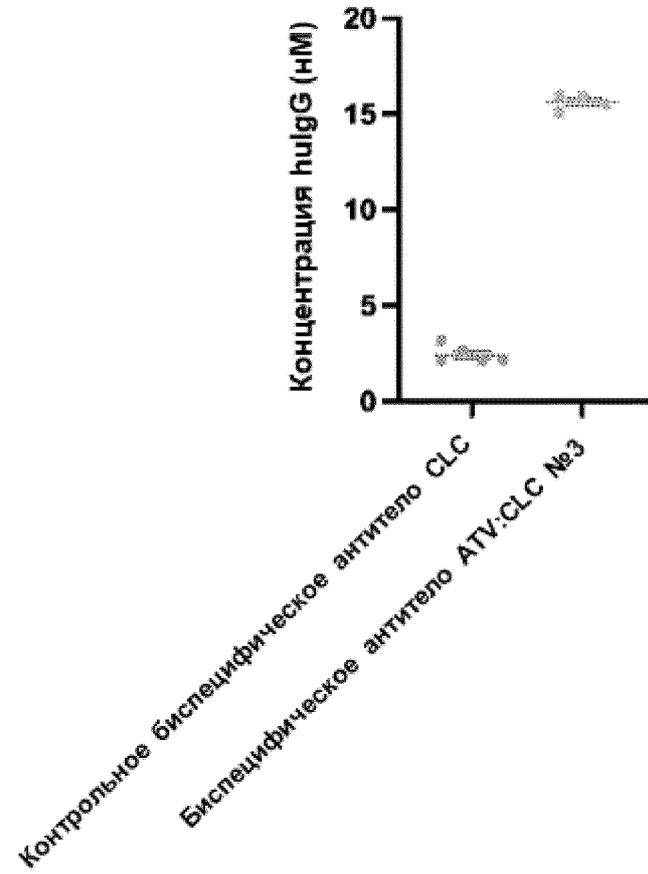


ФИГ. 5В

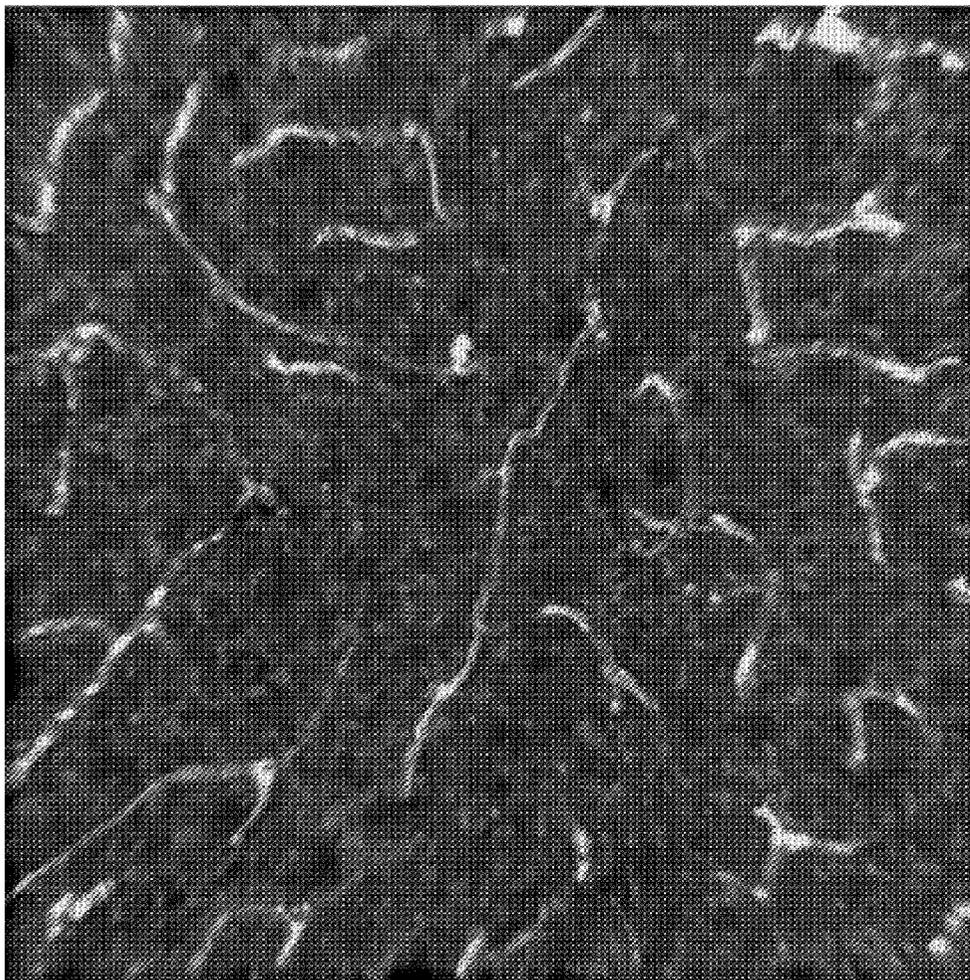


ФИГ. 6**hulG в головном мозге**

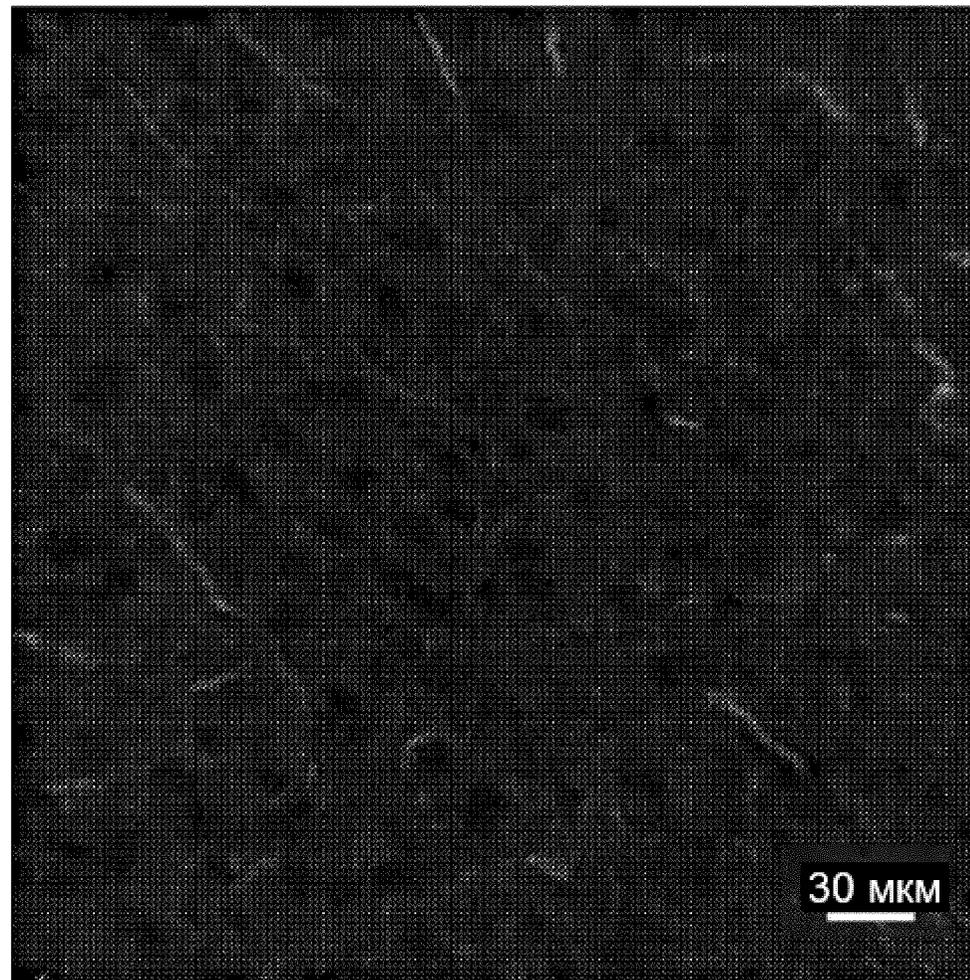
24 ч, 25 мг/кг в/в



ФИГ. 7А

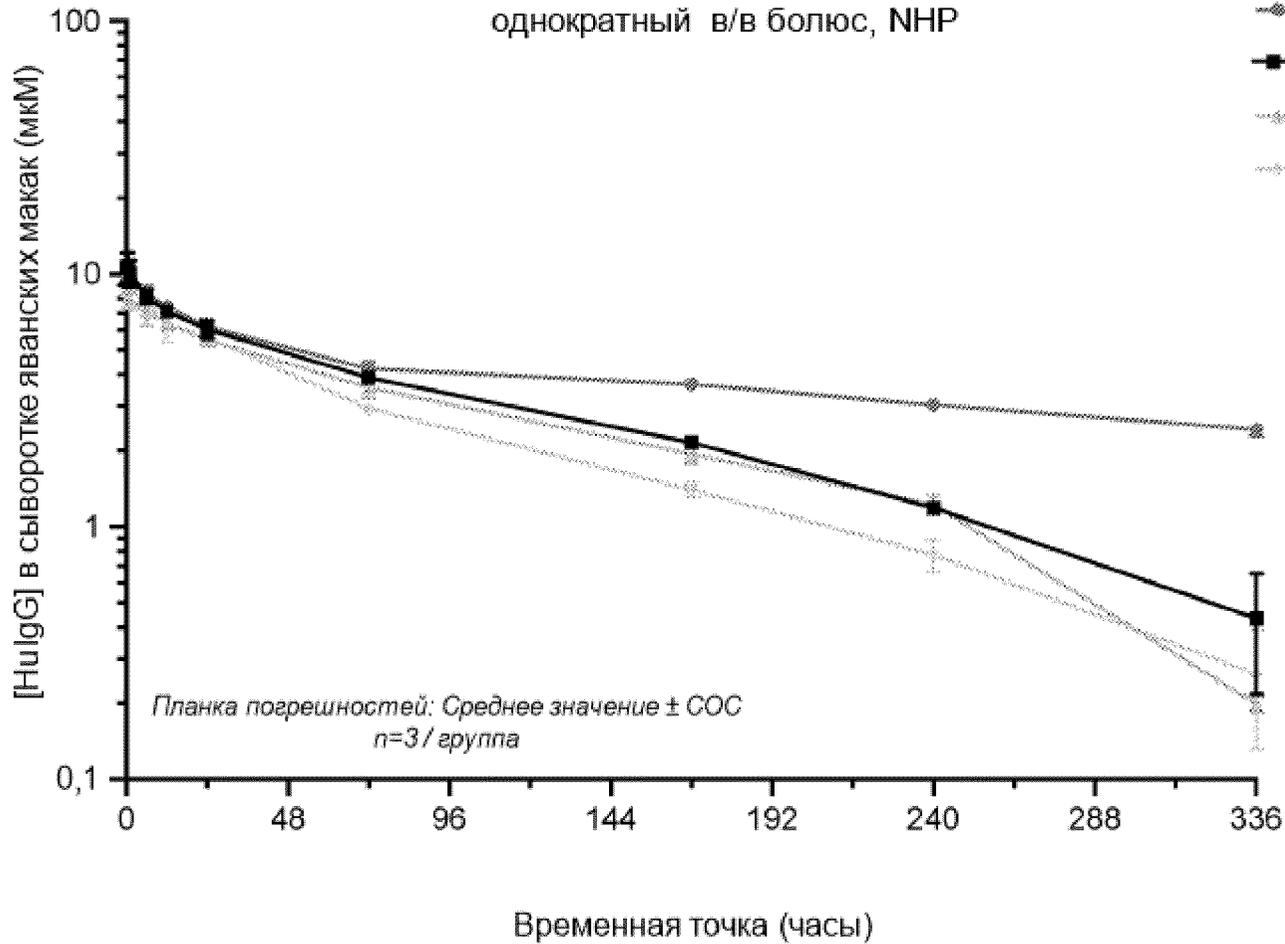


ФИГ. 7В



ФИГ. 8

Концентрация hulgG в сыворотке, 50 мг/кг,
однократный в/в болюс, NHP



ФИГ. 9

Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности

