

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491108 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.28

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.09

(54) МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛА И КОНЬЮГАТЫ

(31) 63/263,835

(32) 2021.11.10

(33) US

(86) PCT/EP2022/081225

(87) WO 2023/083846 2023.05.19

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:

Комер Фрэнк Ирвин, Мэйзор Ярив,
Кастуриранган Шринатх, Ду Цунь, Ян
Чаннинг (US), Бьюкенен Эндрю Гриер
(GB)

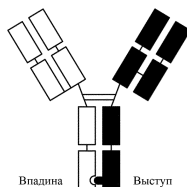
(74) Представитель:

Бильк А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам антител, которые связывают рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и/или с-Met, и к конъюгатам, содержащим такие молекулы антител. Молекулы антител и конъюгаты находят применение при лечении, например, рака.

Антитело RAA22
к EGFR

Антитело B09-57
к сMET



202491108

A1

A1

202491108

МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛА И КОНЬЮГАТЫ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Для настоящей заявки испрашивается приоритет согласно § 119(e) раздела 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 63/263835, поданной 10 ноября 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает посредством ссылки перечень последовательностей, поданный вместе с настоящей заявкой в виде текстового файла под названием "EGFCM-100 Sequence Listing", созданного 17 октября 2022 г. и имеющего размер 95 килобайтов.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к молекулам антител, которые связывают рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и/или с-Met, и к конъюгатам, содержащим такие молекулы антител. Молекулы антител и конъюгаты находят применение при лечении, например, рака.

Предпосылки изобретения

Преодоление лекарственной резистентности является серьезной проблемой, с которой сталкиваются при разработке средств таргетной терапии рака. Существует множество лекарственных средств, направленных на EGFR и с-MET, которые либо одобрены, либо находятся в клинической разработке, но *de novo* и приобретенная резистентность ограничивают их долгосрочную эффективность (Ou, 2016; Voccaccio, 2014; Karamouzis, 2009; Corso, 2010; Chong, 2013; Bertotti, 2015; Benedettini, 2010; Bean, 2007; Bardelli, 2013; Bachleitner-Hofmann, 2008). Механизмы резистентности предусматривают вторичные мутации, активацию нижележащих модулей передачи онкогенного сигнала, таких как KRAS, активацию лигандов и амплификацию альтернативных рецепторов факторов роста. Например, амплификация или сверхэкспрессия белка MET хорошо известна как важный механизм клинической резистентности к ингибиторам EGFR. Аналогичным образом, новые данные свидетельствуют о том, что активация пути EGFR может придавать резистентность к ингибиторам, нацеленным на с-MET (Engelman, 2007; Bertotti, 2015; Benedettini, 2010; Bean, 2007; Bardelli, 2013). Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляют собой растущий класс целенаправленных средств терапии, предназначенных для селективной доставки цитотоксических лекарственных средств непосредственно к опухолевым клеткам (Angevin, 2017; Junutula, 2016; Lambert, 2017; Nasiri, 2018; Sau, 2017; Phillips, 2016). В данном контексте антиген, на который нацелено антитело, в первую очередь применяют в качестве метки для доставки цитотоксического

лекарственного средства, а механизм цитоллиза обычно отличается от биологии мишени. Таким образом, ADC имеют потенциал, позволяющий в значительной степени избежать резистентности, за счет активации альтернативных рецепторов или нижележащих путей передачи сигнала при условии, что мишень присутствует. Тем не менее, терапевтический индекс ADC могут ограничивать нежелательные явления вследствие взаимодействия с мишенью на нормальных клетках (Hinrichs, 2015; Donaghy, 2016; Sau, 2017). Технология биспецифических антител может придавать ADC дополнительную специфичность за счет взаимодействия с двумя различными мишенями на опухолевых клетках для эффективной доставки цитотоксической полезной нагрузки при наличии обеих мишеней (Comer, 2018; Andreev, 2017; Kontermann, 2015; Lü, 2017; Brinkmann, 2017; Fan, 2015; Mazor, 2017). Однако простое нацеливание на два антигена не гарантирует улучшенную селективность в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными нецелевыми клетками, поскольку на свойства данного биспецифического антитела влияет множество факторов (Mazor, 2017; Mazor, 2015). Поэтому было бы желательно разработать биспецифические ADC, которые обладали бы улучшенным нацеливанием на опухолевые клетки, сохраняя при этом нормальную ткань. Такой ADC имеет потенциал для преодоления резистентности, возникающей к средствам таргетной терапии вследствие изменений путей, одновременно сохраняя широту терапевтического диапазона за счет использования избирательного нацеливания, обеспечиваемого биспецифическим антителом.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, HER1, ErbB1) является представителем-основателем семейства тирозинкиназ-рецепторов эпидермального фактора роста человека (Human Epidermal Growth Factor Receptor - HER), которое также включает HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 и HER4/ErbB4 (Arteaga, 2014; Rocha-Lima, 2007; Seshacharyulu, 2012; Vecchione, 2011; Nicholson, 2001). Были одобрены многочисленные средства терапии, направленные против EGFR, как в классе биологических препаратов, так и в классе низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы (TKI) (Troiani, 2016; Chong, 2013; Chan, 2017; Remon, 2018; Dokala, 2016). Несмотря на эти успехи, клиническая польза, достигаемая с помощью таких средств терапии, не соответствует ожиданиям, по причине из широкого профиля экспрессии EGFR при многих типах рака. Существует несколько факторов, которые вносят вклад в наблюдаемые клинические ограничения, в том числе механизмы как внутренней, так и приобретенной резистентности, которые в значительной степени связаны с изменениями путей передачи сигнала (Chong, 2013). Например, при колоректальном раке (CRC) EGFR сверхэкспрессируется у 65–75% и более пациентов, однако объективная частота ответа на антитела к EGFR, такие как цетуксимаб и панитумумаб, была только в диапазоне ~10%

при введении в качестве монотерапии у неотобранных популяций пациентов (Cunningham, 2004; Saltz, 2004). Такие антитела эффективны только для пациентов, у которых опухоли характеризуются экспрессией KRAS дикого типа (~50-55% пациентов), что определяет поддающуюся лечению популяцию пациентов (Jimeno, 2009; Knickelbein, 2015). Более того, вследствие дополнительных механизмов резистентности лишь приблизительно половина подходящих пациентов отвечают на лечение, и, в конечном итоге, все терпят неудачу при такой терапии. Лечение пациентов нацеленными на EGFR лекарственными средствами зачастую ассоциировано с фактами кожной токсичности от умеренной до тяжелой степени, которая возникает у 65–90% пациентов (Lacouture, 2006). Такие явления кожной токсичности могут характеризоваться степенью тяжести от 3 до 4 (критерии NCI-CTCAE) и могут привести к модификациям дозы или прекращению лечения. Следовательно, хотя EGFR характеризуется высоким уровнем экспрессии у широкого диапазона типов опухолей, он представляет сложную мишень для подхода с использованием ADC, что может усугублять такую наблюдаемую токсичность. Разработка ADC, которые могут эффективно нацеливаться на опухоли, экспрессирующие EGFR, не провоцируя неприемлемые явления токсичности, ассоциированные с EGFR, могла бы иметь потенциал для лечения более широкого сегмента популяции EGFR-положительных пациентов по сравнению с существующими средствами терапии.

c-MET представляет собой генный продукт протоонкогена MET, который кодируется хромосомой 7. Белок c-MET представляет собой рецепторную тирозинкиназу, экспрессирующуюся преимущественно на поверхности эпителиальных клеток, которая распознает лишь один известный лиганд, фактор роста гепатоцитов (HGF), также известный как рассеивающий фактор (Giordano, 1989; Prat, 1991). Сигнальная ось c-MET/HGF играет важнейшую роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, подвижности и морфогенеза при ряде нормальных процессов, в том числе заживлении ран, регенерации тканей и органогенезе в ходе развития (Organ, 2011). Об аномальной экспрессии и нарушении регуляции пути c-MET сообщалось при самых различных формах рака человека, в том числе немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, раке желудочно-кишечного тракта, раке головы и шеи, раке поджелудочной железы, раке почек, печеночноклеточном раке и многих других (Organ, 2011; Birchmeier, 2003; Mo, 2017; Sierra, 2011; Trusolino, 2010; Peters, 2012; Vsiansky, 2018). При многих из этих раковых показаний сверхэкспрессия c-MET демонстрирует отрицательную ассоциацию с прогнозом и выживаемостью (Yan, 2015; Kim, 2017a; Kim, 2017b; Kim, 2017c; Li, 2011; Kondo, 2013; Miyamoto, 2011; Liu, 2015; Miyamoto, 2011; Xu, 2016; Sacco, 2015; Gisterek, 2011; Belalcazar, 2012; Guo, 2014; Cappuzzo, 2009). Более того, при некоторых типах рака

c-MET ассоциирован с фенотипом раковых стволовых клеток, который непосредственно связан с резистентностью к средствам терапии, нацеленным на EGFR (Li, 2011; Voccaccio, 2014; Luraghi, 2014; Jun, 2013; De Vacco, 2012). В огромном и все возрастающем числе литературных источников продемонстрировано, что существует перекрещивание и непосредственное взаимодействие между путями передачи сигнала EGFR и c-MET, и что это перекрещивание функционально преобразуется в клинических условиях в резистентность к средствам терапии, нацеленным на EGFR и c-MET (McDermott, 2010; Moogres, 2016; Suda, 2010; Zucali, 2008; Liska, 2011; Huang, 2014; Voccaccio, 2014; Madoz-Gúrpide, 2016; Sohn, 2014; Rho, 2009; Puri, 2008; Peters, 2012; Karamouzis, 2009; Jun, 2013; Haura, 2013; Guo, 2008; Gou, 2016; Engelman, 2007; Cecchi, 2012; Bardelli, 2013). На основе многочисленных доказательств роли c-MET в качестве независимого отрицательного прогностического признака при многих типах опухолей и его участии в качестве механизма резистентности к ингибиторам EGFR, было предпринято множество попыток разработать ингибиторы c-MET в качестве противораковых терапевтических средств. Тем не менее, несмотря на высокую частоту экспрессии c-MET при множестве типов опухолей, разработка эффективных ингибиторов c-MET столкнулась с серьезными проблемами и провалами в клинической практике (Zhang, 2015; Wu, 2017; Ariyawutyakorn, 2016; Marano, 2015; Garber, 2014). Например, в то время как кризотиниб, двойной ингибитор c-MET и ALK, был одобрен для лечения немелкоклеточного рака легкого, другие нацеливающиеся на c-MET лекарственные средства, такие как одноплечевое антитело к c-MET под названием MetMAb (онартузумаб), и низкомолекулярный ингибитор тивантиниб не прошли клинические испытания III фазы поздней стадии вследствие отсутствия эффективности (Mo, 2017; Zhang, 2015; Wu, 2017; пресс-релизы компаний). Правдоподобная гипотеза о несоответствии между широким профилем экспрессии c-MET и ограниченным клиническим ответом на ингибиторы c-MET заключается в том, что только подгруппа таких опухолей управляется путем c-MET, и, соответственно, многие опухоли, экспрессирующие c-MET, не чувствительны к ингибиторам, блокирующим активность передачи сигнала c-MET. В настоящее время ведется клиническая разработка нескольких ингибиторов c-MET, и некоторые из данных программ предусматривают использование стратегии, основанной на биомаркерах, для выявления группы пациентов, опухоли которых зависят от c-MET (Choueiri, 2017; Zhang, 2016; Vouattour, 2018). Клинический опыт на сегодняшний день позволяет предположить, что, как и в случае с ингибиторами EGFR, успешная разработка новых ингибиторов, блокирующих сигнал c-MET, принесет пользу только подгруппе из общей популяции пациентов с опухолями, экспрессирующими c-MET. Разработка эффективного ADC,

направленного на с-MET, смогла бы преодолеть некоторые ограничения ингибиторов, блокирующих сигнал с-MET.

Концепция конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) является простой: ее цель заключается в получении лекарственного средства, характеризующегося широким терапевтическим диапазоном, с использованием исключительной специфичности антител для точной доставки цитотоксического поражающего элемента к раковым клеткам, причиняя при этом минимальное повреждение нормальным тканям (Comer, 2018; Nasiri, 2018; Sau, 2017; de Goeij, 2016; Bouchard, 2014; Junutula, 2016; Lambert, 2017). Хотя концепция и является простой, достижение идеальной комбинации свойств ADC оказалось сложной задачей, о чем свидетельствует ограниченное число ADC, которые были одобрены на сегодняшний день (Tolcher, 2016). В последние годы в данной области наблюдается рост, при этом ADC на клинической стадии в настоящее время насчитывают более 70 лекарственных средств-кандидатов, находящихся в разработке. Несмотря на достигнутые на сегодняшний день успехи и перспективу новых ADC, которые станут доступны пациентам в ближайшие годы, остается еще много проблем и есть значительные возможности для совершенствования. В конечном счете, ключевой проблемой при разработке ADC является баланс между его эффективностью и безопасностью. В настоящее время существует один ADC, направленный на EGFR, депатукизумаб мафодотин (ABT-414), который находится на стадии III клинической разработки компанией AbbVie для лечения глиобластомы (Phillips, 2016). ABT-414 ранее тестировали в испытаниях фазы II в отношении множества дополнительных показаний с солидными опухолями (ClinicalTrials.gov: NCT01741727). В случае данных показаний ADC продемонстрировали ограниченную эффективность в переносимых дозах, а у подвергаемых лечению пациентов зачастую наблюдали токсичность со стороны глаз (Tolcher, 2014). Нацеливающийся на EGFR ADC второго поколения, ABBV-221, находился в клинической разработке, но она была прекращена вследствие проблем с безопасностью (Phillips, 2018; Calvo, 2017; презентация компании). В настоящее время существует один ADC, нацеленный на с-MET, под названием теллизотузумаб ведотин (ABBV-399), который вступает в фазу II клинической разработки для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), опухоли которых характеризуются высокими уровнями экспрессии с-MET, как в качестве монотерапии, так и в комбинации с ингибитором EGFR, эрлотинибом (Angevin, 2017; Wang, 2017). Для комбинации ADC к с-MET+ EGFR TKI была показана клиническая активность в испытаниях фазы I у данной выбранной популяции пациентов, при этом наиболее частыми нежелательными явлениями, связанными с лечением, были периферическая нейропатия и кожная сыпь

(Angevin, 2017; Calvo, 2017). Природа биспецифических антител позволяет точно настраивать взаимодействия между каждой мишенью для того, чтобы влиять на общие свойства молекулы, что может привести к получению ADC с приемлемым терапевтическим диапазоном (Comer, 2018). Данная концепция была протестирована в отношении EGFR и c-MET в условиях *in vitro*, но авторам исследования все еще предстоит продемонстрировать проверку обоснованности концепции *in vivo* с улучшением безопасности или эффективности по сравнению с ADC к EGFR и c-MET, о которых упомянуто выше (Sellmann, 2016). Следовательно, было бы полезным использовать стратегии биспецифических антител для разработки ADC к EGFR-cMET, который демонстрирует как эффективность, так и приемлемым профилем безопасности.

Настоящее изобретение было разработано в свете вышеизложенных соображений.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены молекулы антител и конъюгаты, характеризующиеся комбинациями требуемых биофизических и/или функциональных свойств в сравнении с молекулами антител, раскрытыми в предшествующем уровне техники.

Аспекты настоящего изобретения относятся к молекуле антитела, способной связывать как EGFR, так и c-Met. EGFR и c-Met совместно экспрессируются при многих типах рака, а молекулы антител, которые нацеливаются на обе молекулы ("молекулы биспецифических антител"), открывают возможность для широкой клинической пользы при различных показаниях. Молекула антитела представляет улучшенное средство лечения форм рака по сравнению с моноспецифическими антителами к EGFR или c-Met из предшествующего уровня техники, поскольку молекулы биспецифических антител, описанные в данном документе, способны связываться с обеими мишенями одновременно и, следовательно, характеризуются повышенной селективностью для опухолей, совместно экспрессирующих EGFR и c-MET, по сравнению с нормальными тканями.

Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена молекула антитела, содержащая:

первый антигенсвязывающий домен, который связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); и

второй антигенсвязывающий домен, который связывает c-Met,

где первый антигенсвязывающий домен содержит:

- (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):

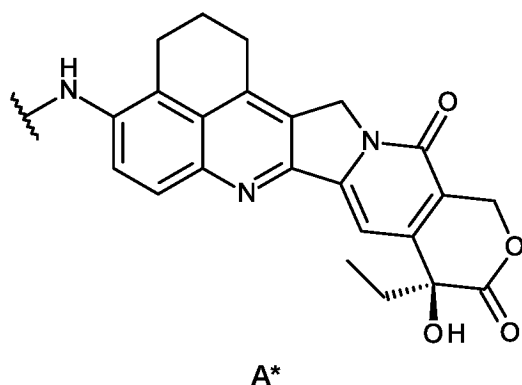
HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:

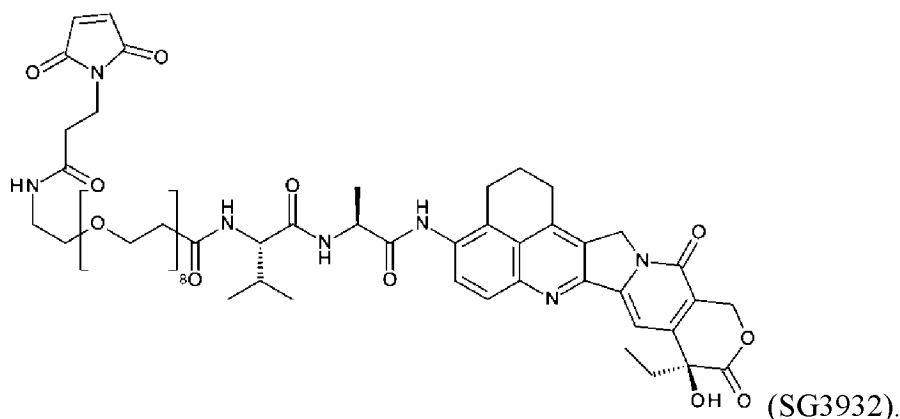
LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

В частности, конъюгаты, содержащие данную молекулу антитела, способны селективно доставлять лекарственное средство (также называемое "полезной нагрузкой" или "поражающим элементом") к опухолям, совместно экспрессирующим эти мишени, и осуществлять лечение данных опухолей с высокой степенью эффективности. В примерах демонстрируется, что различные конъюгаты, содержащие альтернативные поражающие элементы (например, тубулизин или ингибитор топоизомеразы I), проявляют стойкую цитотоксическую активность как в анализах цитотоксичности *in vitro*, так и в моделях лечения рака *in vivo*.

Таким образом, в другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат, содержащий описанную в данном документе молекулу антитела, конъюгированную с лекарственным средством. В некоторых вариантах лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, например, ингибитор топоизомеразы, имеющий формулу A*:



В некоторых вариантах молекула антитела конъюгирована с ингибитором топоизомеразы I, имеющим следующую формулу:



В некоторых вариантах молекула антитела содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR человека с "низкой аффинностью". Используемый в данном документе термин "низкая аффинность" относится к первому антигенсвязывающему домену, который связывается с EGFR человека с константой диссоциации (Kd), которая равна или превышает 10 нМ. Как продемонстрировано в данном документе, раскрытые в данном документе антитела и конъюгаты, содержащие такой низкоаффинный EGFR-антигенсвязывающий домен, проявляют уменьшенную целевую токсичность в нормальных тканях, такой как токсичность в отношении кожи, и, следовательно, характеризуются улучшенным профилем безопасности по сравнению с конъюгатами, содержащими EGFR-антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR человека с "более высокой аффинностью". Используемый в данном документе термин "более высокая аффинность" или "высокая аффинность" относится к первому антигенсвязывающему домену, который связывается с EGFR человека с Kd, которая ниже 10 нМ. Более того, в настоящем изобретении продемонстрировано, что конъюгаты, содержащие низкоаффинный EGFR-антигенсвязывающий домен, более эффективны при лечении рака по сравнению с конъюгатами, содержащими высокоаффинный EGFR-антигенсвязывающий домен (например, фиг. 12).

В настоящем изобретении также предусмотрены молекулы антител, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, и молекулы антител, содержащие второй антигенсвязывающий домен, который связывает c-Met, которые определены в данном документе.

Более того, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие молекулы антител, определенные в данном документе, или конъюгаты, определенные в данном документе.

В настоящем изобретении предусмотрены молекулы антител, конъюгаты и фармацевтические композиции, все из которых определены в данном документе, для применения в способе лечения организма человека или животного, таком как способ

лечения рака. В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака, включающие введение молекулы антитела, конъюгата или фармацевтической композиции, которые определены в данном документе. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака, выбранного из рака поджелудочной железы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SQHN), включающие введение молекулы антитела, конъюгата или фармацевтической композиции, которые определены в данном документе. В некоторых вариантах нуждающийся в лечении рак представляет собой NSCLC.

В настоящем изобретении также предусмотрены нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева, которые определены в данном документе. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения молекулы антитела, которая определена в данном документе.

В настоящем изобретении предусмотрена комбинация описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или ее явно следует избегать.

Краткое описание графических материалов

Варианты и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, будут обсуждаться далее со ссылкой на следующие прилагаемые фигуры.

Фиг. 1А. Графическое изображение RAA22/B09-57. Показаны Fab антитела RAA22 к EGFR, Fab антитела B09-57 к cMET и тяжелые цепи с мутациями по типу "впадина" и "выступ". Рендеринг структуры составлен из структур индивидуальных доменов.

Фиг. 1В. Графическое изображение QD06/B09-57. Показаны Fab антитела QD06 к EGFR, Fab антитела B09-57 к cMET и тяжелые цепи с мутациями по типу "впадина" и "выступ". Рендеринг структуры составлен из структур индивидуальных доменов.

Фиг. 2. Исследования одновременного связывания с использованием формата захвата антигена проводили с помощью анализа Octet. Датчики, загруженные антигеном cMET человека, подвергали последовательным взаимодействиям ассоциации и диссоциации сначала с антителами, затем с антигеном EGFR человека. Ass - ассоциация, Diss - диссоциация, NI-NTA - никель-нитрилотриуксусная кислота.

Фиг. 3А. По результатам ELISA показана перекрестная реактивность с молекулами EGFR и c-Met. Высокоаффинный моноспецифический IgG QD6 к EGFR, а также одновалентное биспецифическое DuetMAb QD6/B09 к EGFR/cMET связывались с EGFR человека, яванского макака и мыши. Моноспецифический IgG RAA22 к EGFR с пониженной аффинностью слабее связывался с EGFR человека, яванского макака и мыши

по сравнению с QD6, а соответствующее одновалентное биспецифическое DuetMAb RAA22/B09 к EGFR/c-Met показало еще более слабое связывание с EGFR человека и яванского макака по сравнению с двухвалентным исходным IgG RAA22 и номинальное связывание с EGFR мыши. Моноспецифический IgG B09 к c-Met, а также все биспецифические варианты показали сравнимое связывание с c-Met человека и яванского макака, но отсутствие поддающегося обнаружению связывания с c-Met мыши.

Фиг. 3В. Результаты ELISA, показывающие семейную специфичность EGFR и c-Met. Ни у одного из протестированных антител не наблюдали какого-либо заметного связывания с любым из белков семейства HER EGFR (HER2, HER3 или HER4) или с каким-либо из представителей семейства c-Met (Ron (CD136) или семафорин 3а).

Фиг. 4. Интернализацию биспецифического mAb RAA22/B09 и направленное перемещение в подкисленные внутриклеточные компартменты визуализировали с применением антител, меченных pH-чувствительным красителем pHAb (Promega). Контрольные антитела включали изотипический контроль R347 и одновалентные биспецифические контрольные антитела RAA22/R347 к EGFR и B09/R347 к cMET. pHAb-меченные антитела инкубировали с клетками рака легкого NCI-H1975 в концентрации 1,25 мкг/мл в инкубаторе с повышенной влажностью при 37°C и в 5% CO₂. Флуоресцентные изображения были фиксировали в указанные моменты времени с помощью системы визуализации с высоким разрешением Operetta с использованием фильтра Су3. Повышенную интенсивность клеточной флуоресценции с течением времени считали свидетельством интернализации и направленного перемещения в кислые внутриклеточные компартменты, что измеряли с помощью pH-чувствительного флуоресцирующего средства.

Фиг. 5. Как и на фиг. 4, интернализацию биспецифического mAb RAA22/B09 и направленное перемещение в подкисленные внутриклеточные компартменты визуализировали с использованием антител, меченных pH-чувствительным красителем pHAb, но клетки обрабатывали антителами в более низкой концентрации, составляющей 0,625 мкг/мл.

Фиг. 6А. Кинетика интернализации моноклональных антител (mAb) QD6/B09 и RAA22/B09 в клетках H1975. (а) Наложения изображений клеток, меченных красителем CellTracker Blue CMAC для окрашивания цитоплазмы (синий) и 2,5 мкг/мл QD6/B09-AlexaFluor647 (пурпурный, верхняя панель) или 2,5 мкг/мл RAA22/B09AlexaFluor-647 (пурпурный, нижняя панель), в начале интернализации и через 1 ч после ее начала. Клетки подвергали мечению красителем CellTracker Blue CMAC, затем связыванию с mAb-

AlexaFluor6457 при температуре 2-8°C и выдерживали в условиях интернализации: (37°C, 70% влажность и 5% CO₂).

Фиг. 6В. Кинетика интернализации моноклональных антител (mAb) QD6/B09 и RAA22/B09 в клетках H1975. Динамику интернализации mAb-AlexaFluor647 определяли с помощью количественного анализа кинетических изображений с использованием алгоритма (раздел "Материалы и способы"). Кинетические изображения, полученные с 5-минутными интервалами, обрабатывали с использованием данного алгоритма (Vainshtein, 2015) для определения накопления антител в цитоплазме. Сигналы антител в цитоплазме, нормализованные к флуоресценции антител в клетке (фракция в цитоплазме), для QD6/B09-AlexaFluor647 (красный) в сравнении с RAA22/B09-AlexaFluor647 (синий) показаны для одного из трех независимых экспериментов. Константу скорости интернализации (k_{int}) рассчитывали, исходя из временной динамики интернализации, с использованием подгонки кривой к уравнению $F_{cyt}(t) = (1 - e^{-k_{int} \cdot t}) \cdot F_{max, cyt}$, где $F_{max, cyt}$ представляет собой максимальное соотношение цитоплазматической интенсивности на клетку к общей интенсивности на клетку. $T_{1/2}$, рассчитанное, исходя из k_{int} , составляло $37,5 \pm 10,6$ мин для QD6/B09 и $43,2 \pm 15,5$ для RAA22/B09 (исходя из $n=3$).

Фиг. 7А. Профили интернализации DuetMab QD6/B09 и соответствующих одноплечевых контрольных антител. Профили интернализации изображены посредством временной динамики соответствующих мембранных и цитоплазматических сигналов для каждой конструкции. Данные для конфигурации QD6/B09 получали с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа Opera.

Фиг. 7В. Профили интернализации DuetMab RAA22/B09 и соответствующих одноплечевых контрольных антител. Профили интернализации изображены посредством временной динамики соответствующих мембранных и цитоплазматических сигналов для каждой конструкции. Данные для конфигурации получали с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа Zeiss с вращающимся диском.

Идентичные профили для QD6/B09 и QD6/IgG указывают на режим интернализации, обусловленный EGFR-плечом DuetMab QD6/B09, тогда как в случае DuetMab RAA22/B09 для эффективной интернализации необходимо взаимодействие как EGFR-плеча, так и с-MET-плеча.

Фиг. 8А. Профиль интернализации ADC RAA22/B09-AZD1508 в клетках, характеризующихся умеренной и высокой экспрессией рецепторов-мишеней с-MET и EGFR на поверхности клеток. Показаны мембранные, цитоплазматические и общие сигналы для ADC RAA22/B09-AF647 в клетках H1975. Показаны результаты одного репрезентативного эксперимента из 2. Для клеток H1975 показано одновременное падение

общей и мембранной интенсивности, что указывает на диссоциацию антитела от поверхности клетки.

Фиг. 8В эквивалентна фиг. 8А, но для клеток HCC827. Клетки HCC827 характеризуются стабильным общим сигналом на протяжении времени эксперимента. Снижение мембранного сигнала является следствием интернализации антител.

Фиг. 9А. Интернализация контрольных одноплечевых антител ADC RAA22/B09-AZD1508 в клетках HCC827. Профили интенсивности одноплечевого RAA22/IgG в ~10 раз ниже, чем у RAA22/B09 вследствие более слабого связывания с EGFR при связывании одним плечом.

Фиг. 9В. Одноплечевое B09/IgG диссоциирует от клеточной мембраны, о чем свидетельствует одновременное падение общего и мембранного сигналов с течением времени.

Фиг. 10. Блокирование EGFR или cMETR снижает активность биспецифического ADC в условиях *in vitro*. Клетки H1975 NCI предварительно обрабатывали избытком исходных антител без поражающего элемента для блокировки либо EGFR, либо cMET. Затем к клеткам добавляли ADC к EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) в серии 4X серийных разведений с конечной концентрацией, находящейся в диапазоне от 67 нМ до 0,0009 нМ. Обработанные клетки культивировали в течение 72 часов в инкубаторе с повышенной влажностью при 37°C и 5% CO₂. Метаболическую активность определяли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo (Promega). Данные нанесены на график в виде процента метаболической активности относительно контроля без обработки. Значения IC₅₀ определяли с использованием логистического нелинейного регрессионного анализа между максимальной жизнеспособностью (клетки без обработки) и максимальным ответом (пиковое подавление) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг. 11. Одновалентные ADC к EGFR или cMET характеризуются сниженной активностью в условиях *in vitro* по сравнению с биспецифическими ADC к EGFR/cMET. Одновалентные ADC конструировали путем объединения в пару каждого связывающего плеча с несвязывающим плечом изотипического контроля (R347) с получением ADC к EGFR (RAA22/R347-AZ1508) и ADC к cMET (B09/R347-AZ1508). ADC добавляли к клеткам H1975 NCI в серии 4X серийных разведений с конечной концентрацией, находящейся в диапазоне от 67 нМ до 0,0009 нМ. Процент метаболической активности определяли так, как описано на фиг. 9.

На **фиг. 12А** показаны результаты испытаний на основе мышей с PDX, проведенных для определения эффективности высокоаффинных (QD6/B09-AZ1508) и низкоаффинных

(RAA22/B09-AZ1508) ADC к EGFR-сMET на большом количестве моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX) рака человека на иммунодефицитных мышах. Каждое соединение тестировали при одном уровне дозы, составляющем 3 мг/кг, на одной мыши для каждой модели PDX, представляющей отдельную опухоль человека. Процент роста опухоли относительно контрольных опухолей без обработки (%T/C) рассчитывали для опухолей, которые выросли больше исходного объема, а процент регрессии опухоли рассчитывали для опухолей, для которых показано уменьшение размера по сравнению с исходным объемом опухоли. На (А) показаны результаты прямого сравнения высокоаффинных и низкоаффинных ADC в каждой модели, а

на **фиг. 12В** показаны каскадные графики для QD6/B09-AZ1508 в порядке ранжирования эффективности;

на **фиг. 12С** показаны каскадные графики для RAA22/B09-AZ1508 в порядке ранжирования эффективности.

Фиг. 13. Исследования эффективности *in vivo* с определением диапазона доз на моделях PDX проводили на бестимусных "голых" мышах, которым односторонне имплантировали в бок фрагменты опухоли, собранные от животных-хозяев. Высокоаффинные ADC QD6/B09-AZ1508 к EGFR-сMET тестировали при уровнях дозы, составляющих 1 и 2 мг/кг, а вариант RAA22/B09-AZ1508 с пониженной аффинностью к EGFR тестировали при 1, 2 и 3 мг/кг, как указано на фигуре. Измерения объема опухоли проводили два раза в неделю после начала введения доз, и результаты представляли в виде линейных графиков объема опухоли с течением времени. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (SEM), а изображения на вставках показывают результаты иммуногистохимического окрашивания EGFR и сMET для каждой модели из опухолевой ткани, взятой из более раннего пассажа модели.

Фиг. 14А. Эффективность *in vivo* биспецифических ADC к EGFR-сMET в подкожной и ортотопической модели PDX поджелудочной железы. **А)** Эффективность *in vivo* высокоаффинных ADC QD6/B09 в подкожной модели PDX MEDI-PANC-08, ● - без обработки, ■ - R347-AZ1508 (3 мг/кг – Q1Wx4), ▲ - QD6/B09-1508 (1 мг/кг – Q1Wx4), ▼ - QD6/B09-1508 (2 мг/кг – Q1Wx4) и ● - QD6/B09-1508 (3 мг/кг – Q1Wx4). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю.

Фиг. 14В. Эффективность *in vivo* низкоаффинных ADC RAA2/B09 в подкожной модели PDX MEDI-PANC-08, ● - без обработки, ■ - R347-AZ1508 (3 мг/кг – Q1Wx4), ▲ - RAA2/B09-1508 (1 мг/кг – Q1Wx4), ▼ - RAA2/B09-1508 (2 мг/кг – Q1Wx4) и ● - RAA2/B09-1508 (3 мг/кг – Q1Wx4). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю.

Фиг. 14С Визуализация с помощью люциферазы ортотопической модели PDX MEDI-PANC-08^{LUC} (экспрессирующей люциферазу). Мышей визуализировали еженедельно с использованием системы визуализации IVIS Spectrum *In vivo*. Изображения нормализуют по всем группам и моментам времени со шкалой излучения (среднее излучение [ф/с/см²/ср]), установленной от максимального сигнала (контрольная группа в день 21) до фона.

Фиг. 14D. Эффективность *in vivo* низкоаффинных ADC RAA2/B09 в подкожной модели PDX MEDI-PANC-08. ● - без обработки, ■ - гемцитабин (75 мг/кг – Q3/4Dx5), ▲ R347-AZ1508 (3 мг/кг – Q1Wx4), ▼ - RAA2/B09-1508 (2 мг/кг – Q1Wx4) и ● - RAA2/B09-1508 (3 мг/кг – Q1Wx4). Дни обработки указаны стрелками, объемы опухолей измеряли дважды в неделю. Данные, изображенные на панелях **A** и **B**, представляют собой средний объем опухоли в группе (мм³) ± SEM, а на панели **D** среднее излучение для группы [ф/с/см²/ср] ± SEM.

Фиг. 15A. Профили зависимости средних концентраций от времени и средние параметры PK по результатам NCA для RAA22/B09-57-AZ1508 у мышей. Концентрацию целевых соединений и общую концентрацию антител измеряли с помощью анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом. **Фиг. 15B.** Профили зависимости средних концентраций от времени и средние параметры PK по результатам NCA для QD6/B09-57-AZ1508 у мышей. Концентрацию целевых соединений и общую концентрацию антител измеряли с помощью анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом.

Сигнатурный триптический пептид в области Fc антитела человека и отщепленный поражающий элемент разделяли с использованием обращенно-фазовой хроматографии (RPLC) с последующим обнаружением с использованием мониторинга множественных реакций (MRM). Сигнатурный пептид в области Fc (VVSVLTVLHQDWLNGK) использовали для расчета общего Ab, тогда как поражающий элемент, высвобождающийся при расщеплении, использовали для расчета ADC RAA22/B09. Внутренним стандартом, используемым в данном эксперименте, является меченный изотопом пептид или белок (SiluMAb, Sigma-Aldrich) или меченный изотопом поражающий элемент. Соотношение площади пика анализируемого материала к внутренним стандартам использовали для расчета относительно стандартной кривой.

Стандартные кривые и результаты QC получали путем внесения ADC RAA22/B09 на разных уровнях в ту же матрицу, что и образцы. Диапазон количественной оценки охватывает от 100 нг/мл до 15000 нг/мл, при этом разведения при QC охватывают до 525000 нг/мл. Стандартную кривую строили путем подгонки с помощью простейшей

возможной модели. Точность и прецизионность анализа находятся в пределах 20% для всех уровней, за исключением LLOQ, для которого они составляют 25%.

Фиг. 16А. Профили зависимости средних концентраций от времени для RAA22/B09-57-AZ1508 у обезьян. Образцы плазмы крови яванских макаков собирали и обрабатывали с использованием анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом и некомпартментного РК-анализа, как описано для фиг. 15.

Фиг. 16В. Профили зависимости средних концентраций от времени для QD6/B09-57-AZ1508 у обезьян. Образцы плазмы крови яванских макаков собирали и обрабатывали с использованием анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом и некомпартментного РК-анализа, как описано для фиг. 15.

Фиг. 16С. Средние параметры РК по результатам NCA для QD6/B09-57-AZ1508 у обезьян. Параметры РК по результатам NCA для QD6/B09-57-AZ1508 при 3 мг/кг в исследовании 20067312 были основаны на РК-данных после второй дозы. Все остальные результаты были основаны на РК-данных после первой дозы. Образцы плазмы крови яванских макаков собирали и обрабатывали с использованием анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом и некомпартментного РК-анализа, как описано для фиг. 15.

Фиг. 17. ADC к EGFR-сMET Maia Toroi оценивали на моделях полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX), представляющих множественные типы рака человека у иммунодефицитных мышей, в качестве испытания на основе PDX. Соединение тестировали при уровне дозы, составляющем 10 мг/кг, на одной мыши для каждой модели PDX, представляющей уникальную опухоль человека. Процент роста опухоли относительно контрольных опухолей без обработки (%T/C) рассчитывали для опухолей, которые выросли больше исходного объема (подавление роста опухоли (%TGI) определяли как процент роста опухоли относительно дня 0 между группой обработки (ТХ) и контрольной группой (В) по следующей формуле: $\%TGI = 1 - (ТХ_{\text{конечный}} - ТХ_{\text{начальный}}) / (С_{\text{конечный}} - С_{\text{начальный}})$, а процент регрессии опухоли рассчитывали для опухолей, у которых показано уменьшение размера по сравнению с начальным объемом опухоли (процент регрессии опухоли определяли как процентную долю уменьшения опухоли у подвергнутых обработке животных относительно объема опухоли в день 0 (день введения начальной дозы), рассчитываемую в конечной точке исследования по следующей формуле: $\% \text{регрессии} = (ТХ_{\text{конечное среднее}} - ТХ_{\text{начальное среднее}}) / (ТХ_{\text{начальное среднее}}) \times 100$).

Фиг. 18. Toroi TM ADC к EGFR-сMET оценивали на моделях полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX), представляющих множественные типы рака человека у иммунодефицитных мышей, в качестве испытания на основе PDX. Соединение

тестировали при уровне дозы, составляющем 5 мг/кг, на одной мыши для каждой модели PDX, представляющей уникальную опухоль человека. Процент роста опухоли относительно контрольных опухолей без обработки (%T/C) рассчитывали для опухолей, которые выросли больше исходного объема (подавление роста опухоли (%TGI) определяли как процент роста опухоли относительно дня 0 между группой обработки (ТХ) и контрольной группой (В) по следующей формуле: $\%TGI = 1 - (ТХ_{\text{конечный}} - ТХ_{\text{начальный}}) / (С_{\text{конечный}} - С_{\text{начальный}})$), а процент регрессии опухоли рассчитывали для опухолей, у которых показано уменьшение размера по сравнению с начальным объемом опухоли (процент регрессии опухоли определяли как процентную долю уменьшения опухоли у подвергнутых обработке животных относительно объема опухоли в день 0 (день введения начальной дозы), рассчитываемую в конечной точке исследования по следующей формуле: $\% \text{регрессии} = (ТХ_{\text{конечное среднее}} - ТХ_{\text{начальное среднее}}) / (ТХ_{\text{начальное среднее}}) \times 100$).

Фиг. 19А. Два различных ADC к EGFR-cMET с разными Fc-форматами IgG (Maia и TM) оценивали на предмет сопоставимости в модели PDX SQHN-02. ADC тестировали при 3 уровнях доз: 2,5, 5 и 10 мг/кг, а рост опухоли сравнивали с контрольными животными без обработки. В общей сложности было обработано по 10 животных на группу обработки и контрольную группу.

Фиг. 19В. Два различных ADC к EGFR-cMET с разными Fc-форматами IgG (Maia и TM) оценивали на предмет сопоставимости в модели PDX Panc-08. ADC тестировали при 3 уровнях доз: 2,5, 5 и 10 мг/кг, а рост опухоли сравнивали с контрольными животными без обработки. В общей сложности было обработано по 10 животных на группу обработки и контрольную группу.

На **фиг. 20** изображены результаты для моделей PDX немелкоклеточного рака легкого NSCLC, представленных выше на фиг. 17, с указанием статуса мутаций EGFR и гистологии, если таковые известны.

Фиг. 21. Фармакокинетические профили биспецифических антител к EGFR-cMET, INT-009 ("голое" mAb RAA22/B09-Maia) и DAR8 ADC INT-009-SG3932 ("MAIA ADC"), сравнивали с зеркальным mAb B09/RAA2-IgG1-TM (INT-017) и ADC TM-зеркальное-SG3932 DAR6 ("TM ADC") у NOD-SCID мышей при терапевтических дозах, составляющих 5 мг/кг.

На **фиг. 22** показаны результаты сравнения деградации рецепторов EGFR и cMet после обработки с помощью Тороi TM ADC к EGFR-cMET в сравнении с амивантамобом.

Подробное описание

Аспекты и варианты настоящего изобретения будут обсуждаться далее со ссылкой на прилагаемые фигуры. Дополнительные аспекты и настоящее изобретение будут очевидными для специалистов в данной области. Все документы, упомянутые в данном тексте, включены в данный документ посредством ссылки.

Мишени

EGFR

EGFR человека (также известный как протоонкоген с-ErbB-1, рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-1 и EC 2.7.10.1) представляет собой белок, идентифицированный в UniProt под номером P00533. Альтернативный сплайсинг mRNA, кодируемой геном *EGFR* человека (также известным как *ERBB*, *ERBB1* и *HER1*), дает четыре изоформы: изоформу 1 (UniProt: P00533-1, v2 (последнее обновление последовательности: 1 ноября 1997 г.)); изоформу 2 (UniProt: P00533-2, v1), которая содержит замены F404L и L405S по сравнению с изоформой 1 и в которой отсутствует аминокислотная последовательность, соответствующая положениям 406-1210 изоформы 1; изоформу 3 (UniProt: P00533-3, v1), которая содержит замены в положениях 628-705 изоформы 1 и в которой отсутствует аминокислотная последовательность, соответствующая положениям 706-1210 изоформы 1; и изоформу 4 (UniProt: P00533-4), которая содержит замену C628S по сравнению с изоформой 1 и в которой отсутствует аминокислотная последовательность, соответствующая положениям 629-1210 изоформы 1.

Обзор структуры и функции EGFR приведен, например, в Ferguson, Annu Rev Biophys. (2008) 37: 353-373. EGFR представляет собой трансмембранный белок, который является рецептором для представителей семейства эпидермальных факторов роста (семейство EGF). Данный рецептор содержит крупную внеклеточную область, один протяженный трансмембранный домен, внутриклеточный околочембранный домен, тирозинкиназный домен и С-концевую регуляторную область. Связывание EGFR с лигандом индуцирует димеризацию рецептора и аутофосфорилирование нескольких остатков тирозина (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 и Y1173) в С-концевой регуляторной области EGFR.

Аномальная экспрессия/активность EGFR имеет отношение ко многим заболеваниям, в том числе нарушениям нервной системы и многим формам рака.

В данном описании "EGFR" относится к EGFR от любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи EGFR от любого вида.

c-Met

c-Met человека (также известный как рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR) или тирозин-протеинкиназа Met) представляет собой белок, идентифицированный в UniProt

под номером P08581. Альтернативный сплайсинг mRNA, кодируемой геном *MET* человека, дает три изоформы: изоформу 1 (UniProt: P08581-1, v4 (последнее обновление последовательности: 7 июля 2009 г.)); изоформу 2 (UniProt: P08581-2), в которой аминокислотная последовательность "STWWKEPLNIVSFLFCFAS" вставлена в положение 755 изоформы 1; и изоформу 3 (UniProt: P08581-3), также известную как растворимый вариант 4, в которой аминокислотная последовательность, соответствующая положениям 755-764 изоформы 1, заменена на "RHVNIALIQR" и в котором дополнительно отсутствует аминокислотная последовательность, соответствующая положениям 765-1390 изоформы 1.

Обзор структуры с-Met приведен, например, в Gherardi, 2003, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. с-Met представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа-цепи (50 кДа) и бета-цепи (145 кДа), связанных дисульфидной связью. с-Met содержит N-концевой домен Sema, который опосредует связывание с фактором роста гепатоцитов (HGF), и внутриклеточный киназный домен. Связывание лиганда на поверхности клетки индуцирует аутофосфорилирование с-Met в его внутриклеточном домене, что создает сайты докинга для нижележащих молекул путей передачи сигнала и активацию нескольких каскадов передачи сигнала.

В нормальных тканях с-Met экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток. Сверхэкспрессия с-Met наблюдается во многих опухолях и формах рака человека, что зачастую ассоциировано с метастатическим фенотипом и неблагоприятным прогнозом. Примеры форм рака, при которых наблюдались высокие уровни экспрессии с-Met, включают немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы и рак пищевода и желудка. При таких формах рака зачастую наблюдается совместная экспрессия EGFR и с-Met.

Молекулы антител

В настоящем изобретении предусмотрены молекулы антител. Молекулы антител согласно настоящему изобретению могут обеспечиваться в выделенной форме, в том смысле, что они не содержат примесей, таких как антитела, способные связывать другие полипептиды, и/или компоненты сыворотки крови.

Термин "молекула антитела" описывает иммуноглобулин, полученный либо естественным, либо частично или полностью синтетическим путем. Молекула антитела может быть человеческой или гуманизированной. Молекула антитела предпочтительно представляет собой молекулу моноклонального антитела. Примерами антител являются изотипы иммуноглобулинов, такие как иммуноглобулин G (IgG), и их изотипические подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также их фрагменты.

Таким образом, термин "молекула антитела", используемый в данном документе, включает фрагменты антитела при условии, что они проявляют связывание с соответствующей(-ими) молекулой(-ами)-мишенью(-ями). Примеры фрагментов антител включают Fv, scFv, Fab, scFab, F(ab')₂, Fab₂, диатела, триатела, scFv-Fc, минитела и однодоменные антитела (например, VhH) и т. д.). Если контекст не требует иного, термин "молекула антитела", используемый в данном документе, таким образом эквивалентен термину "молекула антитела или ее фрагмент".

Молекулы антител и способы их конструирования и применения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 (2005). Можно брать молекулы моноклональных и других антител и применять методики технологии рекомбинантной ДНК для получения молекул других антител или химерных молекул, которые сохраняют специфичность исходного антитела. Такие методики могут включать введение CDR или переменных областей одной молекулы антитела в другую молекулу антитела (EP-A-184187, GB 2188638A и EP-A-239400).

В свете современных методик, связанных с технологией моноклональных антител, можно получить молекулы антител к большинству антигенов. Антигенсвязывающий домен может быть частью антитела (например, Fab-фрагментом) или синтетическим фрагментом антитела (например, одноцепочечным Fv-фрагментом (ScFv)). Подходящие моноклональные антитела к выбранным антигенам можно получить с помощью известных методик, например, описанных в "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и в "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Химерные антитела обсуждаются у Neuberger, 1988.

Молекулы антител согласно настоящему изобретению содержат антигенсвязывающий домен. Термин "антигенсвязывающий домен" описывает часть молекулы, которая связывается со всем или частью антигена-мишени. Если антиген является крупным, то антитело может связываться только с конкретной частью антигена, при этом данная часть называется эпитопом. Антигенсвязывающий сайт антитела может обеспечиваться одним или несколькими переменными доменами антитела. Антигенсвязывающий сайт антитела предпочтительно содержит переменную область легкой цепи (VL) и переменную область тяжелой цепи (VH). Области VH и VL антигенсвязывающего домена вместе составляют область Fv.

Антигенсвязывающий домен обычно содержит шесть определяющих комплементарность областей (CDR); три в области VH: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три в

области VL: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Шесть CDR вместе определяют паратоп антигенсвязывающего домена, который является частью антигенсвязывающего домена, связывающейся с антигеном-мишенью.

Область VH и область VL содержат каркасные области (FR) по обе стороны от каждой CDR, которые обеспечивают остов для CDR. Области VH характеризуются следующей структурой от N-конца к С-концу: N-конец-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-С-конец; а области VL характеризуются следующей структурой: N-конец-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-С-конец.

Существует несколько различных подходов для определения CDR и FR антител, такие как описанные в Kabat, 1991, Chothia, 1987, система нумерации IMGT, которая описана в LeFranc, 2015, и VBASE2, которая описана в Retter, 2005. CDR и FR областей VH и областей VL молекул антител, описанных в данном документе, определяли в соответствии с Kabat (Kabat, 1991).

Молекулы антител, которые содержат по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, каждый из которых способен связываться с различной мишенью, можно назвать “молекулами биспецифических антител”. И наоборот, молекулы антител, которые связываются лишь с одной мишенью (например, EGFR или с-Met), называются “молекулами моноспецифических антител”. В настоящем изобретении предусмотрена молекула биспецифического антитела, которая содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met.

Антигенсвязывающие домены к EGFR

Антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит CDR молекулы антитела, которая способна связываться с EGFR. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, дополнительно содержит FR молекулы антитела, которая способна связываться с EGFR. То есть, в некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH и область VL молекулы антитела, которая способна связываться с EGFR.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона EGFR-связывающего антитела, описанного в данном документе (т. е. клонов антитела RAA22 или QD6 к EGFR), или получены из нее. Предпочтительно, антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL из RAA22 или получены из нее.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит три HCDR или три LCDR, предпочтительно три CDR VH и три CDR VL, клонов антител RAA22 или QD6 к EGFR, предпочтительно RAA22. Последовательности доменов VH и VL из антител RAA22 и QD6 описаны в данном документе, и, таким образом, можно определить три CDR домена VH и три CDR домена VL указанных антител из указанных последовательностей.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (1) или (2), представленным ниже:

(1) область VH, содержащую следующие CDR:

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,
HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,
HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,
или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой, или

(2) область VH, содержащую следующие CDR:

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,
HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7,
HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,
или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (1), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (1) или (2), представленным выше, где область VH дополнительно содержит FR согласно (3), представленному ниже:

(3) HFR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8,
HFR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9,
HFR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10,
HFR4, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11,
или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HFR1, HFR2, HFR3 или HFR4 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH, содержащую CDR согласно (1) или (2), представленным выше, и FR согласно (3), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (4) или (5), представленным ниже:

(4) область VH, содержащую CDR согласно (1) и FR согласно (3),

(5) область VH, содержащую CDR согласно (2) и FR согласно (3).

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (4), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (6) или (7), представленным ниже:

(6) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16,

(7) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно (6), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (8) или (9), представленным ниже:

(8) область VL, содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LCDR1, LCDR2 или LCDR3 заменены другой аминокислотой.

(9) область VL, содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

66,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

67,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LCDR1, LCDR2 или LCDR3 заменены другой аминокислотой.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (8), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (8) или (9), представленным выше, где область VL дополнительно содержит FR согласно (10), представленному ниже:

- (10) LFR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, LFR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, LFR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, LFR4, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LFR1, LFR2, LFR3 или LFR4 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL, содержащую CDR согласно (8) или (9), представленным выше, и FR согласно (10), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (11) или (12), представленным ниже:

- (11) область VL, содержащую CDR согласно (8) и FR согласно (10),
(12) область VL, содержащую CDR согласно (9) и FR согласно (10).

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (11), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (13) или (14), представленным ниже:

- (13) область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20,
(14) область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VL согласно (13), представленному выше.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH согласно любому из (1)-(7), представленных выше, и область VL согласно любому из (8)-(14), представленных выше. В некоторых предпочтительных вариантах антигенсвязывающий домен содержит область VH согласно любому из (1), (4) и (6) и область VL согласно любому из (8), (11) и (13). В других вариантах антигенсвязывающий домен содержит область VH согласно любому из (2), (5) и (7) и область VL согласно любому из (9), (12) и (14).

Антигенсвязывающие домены к с-Met

Антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит CDR молекулы антитела, которая способна связываться с с-Met. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, дополнительно содержит FR молекулы антитела, которая способна связываться с с-Met. То есть, в некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH и область VL молекулы антитела, которая способна связываться с с-Met.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона с-Met-связывающего антитела, описанного в данном документе (т. е. клона B09-GL антитела к с-Met), или получены из нее.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит три HCDR или три LCDR, предпочтительно три CDR VH и три CDR VL из клона B09-GL с-Met-связывающего антитела. Последовательности доменов VH и VL из антител B09-GL описаны в данном документе, и, таким образом, можно определить три CDR домена VH и три CDR домена VL указанных антител из указанных последовательностей.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH согласно (15), представленному ниже:

(15) область VH, содержащую следующие CDR:

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

24,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

25,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

26,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH согласно (15), представленному выше, где область VH дополнительно содержит FR согласно (16), представленному ниже:

(16) HFR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, HFR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31, HFR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, HFR4, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HFR1, HFR2, HFR3 или HFR4 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит VH согласно (17), представленному ниже:

(17) область VH, содержащую CDR согласно (15) и FR согласно (16).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH согласно (18), представленному ниже:

(18) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VL согласно (19), представленному ниже:

(19) область VL, содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LCDR1, LCDR2 или LCDR3 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VL согласно (19), представленному выше, где область VL дополнительно содержит FR согласно (20), представленному ниже:

- (20) LFR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, LFR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, LFR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, LFR4, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LFR1, LFR2, LFR3 или LFR4 заменены другой аминокислотой.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VL согласно (21), представленному ниже:

- (21) область VL, содержащую CDR согласно (19) и FR согласно (20).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VL согласно (22), представленному ниже:

- (22) область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH согласно любому из (15)-(18), представленных выше, и область VL согласно любому из (19)-(22), представленных выше.

Антигенсвязывающие домены молекулы биспецифического антитела

В настоящем изобретении предусмотрена молекула антитела (т. е. молекула биспецифического антитела), содержащая первый антигенсвязывающий домен, который содержит CDR антигенсвязывающего домена, который способен связываться с EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который содержит CDR антигенсвязывающего домена, который способен связываться с с-Met. В некоторых вариантах первый антигенсвязывающий домен содержит CDR и FR антигенсвязывающего домена, который способен связываться с EGFR, а второй антигенсвязывающий домен содержит CDR и FR антигенсвязывающего домена, который способен связываться с с-Met. То есть, в некоторых вариантах молекула антитела содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий область VH и область VL антигенсвязывающего домена, который способен связываться с EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий область VH и область VL антигенсвязывающего домена, который способен связываться с с-Met.

В некоторых вариантах первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона EGFR-связывающего антитела, описанного в данном документе (например, клонов

RAA22 или QD6 антитела к EGFR, предпочтительно RAA22), или получены из нее, а второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона с-Met-связывающего антитела, описанного в данном документе (например, клона B09-GL антитела к с-Met), или получены из нее. Биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR и содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона RAA22 EGFR-связывающего антитела или получены из нее, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met и содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL клона B09-GL с-Met-связывающего антитела или получены из нее, может называться “RAA22/B09” или “молекула биспецифического антитела RAA22/B09”.

В некоторых вариантах первый антигенсвязывающий домен содержит:

область VH согласно любому из (1)-(7), представленных выше, и область VL согласно любому из (8)-(14), представленных выше; и второй антигенсвязывающий домен содержит:

область VH согласно любому из (15)-(18), представленных выше, и область VL согласно любому из (19)-(22), представленных выше.

В некоторых предпочтительных вариантах первый антигенсвязывающий домен содержит:

область VH согласно любому из (1), (4) и (6), представленных выше, и область VL согласно любому из (8), (11) и (13), представленных выше; и второй антигенсвязывающий домен содержит:

область VH согласно любому из (15)-(18), представленных выше, и область VL согласно любому из (19)-(22), представленных выше.

Например, в предпочтительном варианте молекула антитела по настоящему изобретению содержит:

первый антигенсвязывающий домен, который связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); и

второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и
(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

В дополнительном предпочтительном варианте первый антигенсвязывающий домен содержит:

область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16; и

область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20,

и/или второй антигенсвязывающий домен содержит:

область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 38; и

область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40.

Замены в CDR

В вариантах согласно настоящему изобретению, в которых одна или несколько аминокислот заменены другой аминокислотой, замены могут быть консервативными заменами, например, согласно следующей таблице. В некоторых вариантах аминокислоты заменены аминокислотами, находящимися в том же блоке в среднем столбце, т. е., например, неполярная аминокислота заменена другой неполярной аминокислотой. В некоторых вариантах аминокислоты заменены аминокислотами, находящимися в той же строке в самом правом столбце, т. е., например, А или Р заменена на G.

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярные	- C S T M

	незаряженные	N Q
	Полярные - заряженные	D E K R
АРОМАТИЧЕСКИЕ		H F W Y

В некоторых вариантах замена(-ы) может(-гут) быть функционально консервативной(-ыми). То есть, в некоторых вариантах замена может не влиять (или может практически не влиять) на одно или несколько функциональных свойств (например, аффинность связывания) антигенсвязывающего домена, содержащего замену, по сравнению с эквивалентным антигенсвязывающим доменом без замены.

Константная область

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит константную область тяжелой цепи (СН) иммуноглобулина. В некоторых вариантах СН представляет собой последовательность константной области тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM или получена из нее.

В некоторых вариантах область СН представляет собой константную область иммуноглобулина G1 человека (IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; SEQ ID NO: 42) или ее фрагмент.

В некоторых вариантах область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 63 или 64. В предпочтительных вариантах область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 63 или 64.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит тяжелую цепь, которая содержит область VH, описанную в данном документе, и область СН, описанную в данном документе, или состоит из них.

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит константную область легкой цепи (CL) иммуноглобулина или ее фрагмент. В некоторых

вариантах область CL представляет собой область CL каппа-цепи, представленную под SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48, или получена из нее. В некоторых вариантах область CL представляет собой область CL лямбда-цепи, представленную под SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 65, или получена из нее. В некоторых вариантах молекула антитела содержит первую область CL, которая представляет собой область CL каппа-цепи, представленную под SEQ ID NO: 47 или 48, или получена из нее; и вторую область CL, которая представляет собой область CL лямбда-цепи, представленную под SEQ ID NO: 49 или 65, или получена из нее.

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит:

первую тяжелую цепь, где первая тяжелая цепь содержит область VH первого антигенсвязывающего домена и первую константную область тяжелой цепи (CH) или ее фрагмент;

первую легкую цепь, где первая легкая цепь содержит область VL первого антигенсвязывающего домена и первую константную область легкой цепи (CL) или ее фрагмент;

вторую тяжелую цепь, где вторая тяжелая цепь содержит область VH второго антигенсвязывающего домена и вторую константную область тяжелой цепи (CH) или ее фрагмент; и

вторую легкую цепь, где вторая легкая цепь содержит область VL второго антигенсвязывающего домена и вторую константную область легкой цепи (CL) или ее фрагмент.

Первая и вторая области CH могут быть одинаковыми или разными. Другими словами, первая и вторая области CH могут образовывать гомодимер или гетеродимер. Например, асимметричные молекулы биспецифических антител содержат разные первую и вторую области CH, как более подробно описано ниже. Первая и вторая области CL могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах первая область CL представляет собой область CL каппа-цепи, представленную под SEQ ID NO: 47 или 48, или получена из нее; и вторая область CL представляет собой область CL лямбда-цепи, представленную под SEQ ID NO: 49 или 65, или получена из нее.

Следует понимать, что когда молекула антитела содержит первую область VH и первую область CH, эти области вместе образуют первую тяжелую цепь молекулы антитела, то есть первая область VH и первая область CH соединены друг с другом. Аналогично, вторая область VH и вторая область CH образуют вторую тяжелую цепь молекулы антитела; первая область VL и первая область CL образуют первую легкую

цепь молекулы антитела; и вторая область VL и вторая область CL образуют вторую легкую цепь молекулы антитела.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи B-09-GL, представленной под SEQ ID NO: 50, тяжелой цепи QD6, представленной под SEQ ID NO: 53, тяжелой цепи RAA22, представленной под SEQ ID NO: 56, тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 59, или тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит первую и вторую тяжелую цепь, где

(i) первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи B-09-GL, представленной под SEQ ID NO: 56; и

(ii) вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи RAA22, представленной под SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит первую и вторую тяжелую цепь, где

(i) первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 59; и

(ii) вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более

предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит легкую цепь, которая содержит область VL, описанную в данном документе, и область CL, описанную в данном документе, или состоит из них.

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью легкой цепи B-09-GL, представленной под SEQ ID NO: 52, легкой цепи QD6, представленной под SEQ ID NO: 55, легкой цепи RAA22, представленной под SEQ ID NO: 58, легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 61, или легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит первую и вторую тяжелую цепь, где

(i) первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью легкой цепи RAA22, представленной под SEQ ID NO: 58; и

(ii) вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью легкой цепи B-09-GL, представленной под SEQ ID NO: 52,

В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, содержит первую и вторую тяжелую цепь, где

(i) первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 61; и

(ii) вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 62.

CH, CL, тяжелая цепь и/или легкая цепь молекул антитела, описанных в данном документе, могут содержать одну или несколько модификаций, например, для устранения или уменьшения эффекторных функций Fc, стимуляции образования гетеродимерной молекулы антитела, для увеличения эффективности образования пар когнатных тяжелых и легких цепей и/или для содействия образованию конъюгата, как более подробно описано ниже. CH, CL, тяжелая цепь и легкая цепь, которые были подвергнуты модификации, могут называться модифицированными CH, CL, тяжелой цепью и легкой цепью соответственно.

Молекула антитела может содержать мутацию в области(-ях) CH тяжелой цепи(-ей) для уменьшения или устранения связывания молекулы антитела с одним или несколькими Fc γ -рецепторами, такими как Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII и/или с системой комплемента. Такие мутации устраняют или уменьшают эффекторные функции Fc. Мутации, направленные на уменьшение или устранение связывания молекулы антитела с одним или несколькими Fc γ -рецепторами и системой комплемента, известны и включают "тройную мутацию" или "TM", представляющую собой L234F/L235E/P331S, описанную, например, у Organesyan, 2008. Другие мутации, о которых известно, что они модулируют эффекторную функцию антитела, описаны, например, у Wang, 2018.

Таким образом, в некоторых вариантах первая и/или вторая тяжелая цепь (предпочтительно обе) содержат фенилаланин (F) в положении 234, глутаминовую кислоту (E) в положении 235 и серин (S) в положении 331, где нумерация соответствует EU-индексу. Например, одна или обе (предпочтительно обе) из первой и второй тяжелых цепей могут содержать область CH, имеющую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 42, и содержать фенилаланин (F) в положении 234, глутаминовую кислоту (E) в положении 235 и серин (S) в положении 331, где нумерация

соответствует EU-индексу. Как показано в примерах (например, в примере 12), было продемонстрировано, что включение ТМ в тяжелую цепь улучшает фармакокинетические свойства иллюстративных молекул антител и ADC.

Примерами областей СН, содержащих тройную мутацию, являются последовательности под SEQ ID NO: 63 и 64. Таким образом, в некоторых вариантах одна из первой и второй тяжелых цепей содержит область СН, имеющую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 63, а другая тяжелая цепь содержит область СН, имеющую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 64, где одна или обе (предпочтительно обе) области СН содержат фенилаланин в положении 234, глутаминовую кислоту в положении 235 и серин в положении 331, где нумерация соответствует EU-индексу.

Примерами тяжелых цепей, содержащих область СН, содержащую тройную мутацию, являются последовательности под SEQ ID NO: 59 и 60. Таким образом, в некоторых вариантах одна из первой и второй тяжелых цепей имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 59, а другая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 60, где одна или обе (предпочтительно обе) цепи содержат фенилаланин в положении 234, глутаминовую кислоту в положении 235 и серин в положении 331, где нумерация соответствует EU-индексу.

Область VL и CL, а также область VH и область CH1 молекулы антитела вместе составляют область Fab. Остальная часть молекулы антитела составляет область Fc.

Если не указано иное, положения аминокислотных остатков в константном домене, в том числе положения аминокислотных последовательностей, замен, делеций и вставок, которые описаны в данном документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией EU (Edelman, 2007).

Биспецифические форматы

Молекулы биспецифических антител могут обеспечиваться в любом подходящем формате. Подходящие форматы для молекулы биспецифического антитела, описанной в данном документе, и способы ее получения описаны в Kontermann, MAbs 2012, 4(2):182-197 и Kontermann and Brinkmann 2015, 20(7): 838-847, оба из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См., в частности, фиг. 2 из Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-19.

Молекулы биспецифических антител также можно получить из существующих антител путем химической конъюгации. Например, две молекулы IgG или два Fab'-фрагмента могут быть связаны с помощью гомо- или гетеробифункциональных связывающих реагентов, например, как описано в Graziano and Guptill, Methods Mol Biol. 2004; 283:71-85.

В некоторых вариантах молекулы биспецифического антитела могут представлять собой молекулу биспецифического антитела, подобного иммуноглобулину G (IgG-подобного). Молекула IgG-подобного биспецифического антитела может содержать область Fv, область Fab или sVD, специфическую в отношении одного антигена, Fv/Fab/sVD, специфическую в отношении другого антигена, и область Fc Молекулы IgG-подобных биспецифических антител могут быть как симметричными, так и асимметричными. Молекула биспецифического антитела предпочтительно является асимметричной.

Симметричные молекулы IgG-подобных биспецифических антител обычно содержат антигенсвязывающий домен, который слит с N- или C-концом тяжелой или легкой цепи молекулы IgG, например, в форме scFv-фрагмента или одиночного вариабельного домена. Характерным свойством данных симметричных молекул IgG-подобных биспецифических антител является то, что они содержат две идентичные тяжелые цепи. Более того, симметричные молекулы IgG-подобных биспецифических антител, как правило, являются двухвалентными для каждого эпитопа. Используемая в данном документе "валентность" относится к числу антигенсвязывающих областей, которые способны связывать одиночный эпитоп, молекуле антитела. Молекула моноклонального моноспецифического антитела IgG является двухвалентной для одного эпитопа – она содержит два антигенсвязывающих домена, каждый из которых способен связывать эпитоп на одной молекуле-мишени. Симметричная молекула IgG-подобного биспецифического антитела является двухвалентной для каждого эпитопа – она, как правило, содержит четыре антигенсвязывающих домена, два из которых способны связывать первый эпитоп на

молекуле-мишени, и два из которых способны связываться со вторым эпитопом на молекуле-мишени.

Примеры симметричных молекул IgG-подобных биспецифических антител включают DVD-IgG, IgG-scFv, scFv-IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFab, scFab-IgG, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 in 1-IgG, mAb², TANDEMAb с общей LC. Их можно получить с помощью способов, известных из уровня техники, например, путем химического сшивания, соматической гибридизации или окислительно-восстановительного способа.

Напротив, асимметричные молекулы IgG-подобных биспецифических антител, как правило, являются одновалентными для каждой мишени. Как описано, например, в Klein, 2012, считается, что концепция одновалентных биспецифических IgG имеет уникальную терапевтическую нишу, поскольку они (i) не вызывают гомодимеризации рецепторов, (ii) потенциально характеризуются сниженной токсичностью для нецелевых тканей вследствие потери авидности для каждого антигена и (iii) характеризуются лучшей селективностью, если оба антигена либо селективно ограничены экспрессией на клетках-мишенях, либо экспрессируются на них в большом количестве. Таким образом, в некоторых вариантах молекула антитела представляет собой асимметричную молекулу IgG-подобного биспецифического антитела.

Асимметричные молекулы IgG-подобных биспецифических антител предусматривают гетеродимеризацию двух различных тяжелых цепей и образование правильных пар из когнатных легкой цепи и тяжелой цепи. Гетеродимеризацию тяжелых цепей можно осуществить с помощью нескольких методик, таких как "выступы-во-впадины", электростатическое наведение СНЗ, сконструированные домены с обменом нитей СНЗ и лейциновые застёжки. Образование пары из правильной легкой и тяжелой цепи можно гарантировать путем использования одной из таких методик гетеродимеризации тяжелой цепи вместе с применением общей легкой цепи, кроссовера доменов СН1 и CL, соединения тяжелой и легкой цепей с помощью линкера, *in vitro* сборки димеров тяжелая цепь-легкая цепь из двух отдельных моноклональных антител, конструирования поверхности контакта всего Fab-домена или конструирования дисульфидных связей на поверхности контакта СН1/CL.

Примеры асимметричных молекул IgG-подобных биспецифических антител включают DuetMab, IgG с мутациями "выступ-во-впадину", IgG с мутациями "выступ-во-впадину" с общей LC, CrossMab, IgG-scFab с мутациями "выступ-во-впадину", mAb-Fv, заряженные пары и SEED-антитело.

В некоторых вариантах молекулы антител содержат одну или несколько модификаций в одном или нескольких из доменов СН1, СН2 и СН3, которые содействуют образованию

гетеродимерной молекулы антитела. Например, молекула антитела DuetMab, описанная выше, может дополнительно содержать одну или несколько модификаций в одном или нескольких из доменов CH1, CH2 и CH3, которые содействуют образованию гетеродимерной молекулы антитела. Они могут предусматривать стратегию "выступы-вопьядины" (KiH), основанную на одиночных аминокислотных заменах в доменах CH3, которые содействуют гетеродимеризации тяжелых цепей, описанную в Ridgway, 1996. В варианте CH3 тяжелой цепи с "выступом" небольшая аминокислота была заменена на более крупную, а в варианте со "впадиной" крупная аминокислота была заменена на меньшую. Также могут быть введены дополнительные модификации для стабилизации связи между тяжелыми цепями.

Модификации CH3 для усиления гетеродимеризации включают, например, Y407V/T366S/L368A на одной тяжелой цепи и T366W на другой тяжелой цепи, а также S354C/T366W на одной тяжелой цепи и Y349C/Y407V/T366S/L368A на другой тяжелой цепи, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

Другие примеры модификации CH3 для усиления гетеродимеризации описаны, например, в таблице 1 из Brinkmann and Kontermann, 2017 MABS 9(2), 182-212, которая конкретно включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит первую и вторую тяжелые цепи, которые образуют гетеродимер, где одна из первой и второй тяжелых цепей содержит остаток цистеина (C) в положении 354 и остаток триптофана (W) в положении 366, а другая тяжелая цепь содержит остаток цистеина (C) в положении 349, остаток валина (V) в положении 407, серин (S) в положении 366 и аланин (A) в положении 368, где нумерация константной области соответствует EU-индексу. Например, одна из первой и второй тяжелых цепей может иметь последовательность, представленную под SEQ ID NO: 42, и дополнительно содержит остаток цистеина (C) в положении 354 и остаток триптофана (W) в положении 366, а другая тяжелая цепь имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 42, и дополнительно содержит остаток цистеина (C) в положении 349, остаток валина (V) в положении 407, серин (S) в положении 366 и аланин (A) в положении 368, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит:

(i) первую тяжелую цепь, содержащую первую модифицированную область CH3, где первая модифицированная область CH3 содержит остаток цистеина (C) в положении 354 и остаток триптофана (W) в положении 366; и

(ii) вторую тяжелую цепь, содержащую вторую модифицированную область CH3, где вторая модифицированная область CH3 содержит остаток цистеина (C) в

положении 349, остаток валина (V) в положении 407, серин (S) в положении 366 и аланин (A) в положении 368,

где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

Конкретный иллюстративный формат асимметричных молекул IgG-подобных биспецифических антител называется "DuetMab". Молекулы антитела DuetMab предусматривают применение технологии КИП для гетеродимеризации 2 различных тяжелых цепей и увеличивает эффективность образования пар когнатных тяжелых и легких цепей за счет замены нативной дисульфидной связи на одной из поверхностей контакта CH1-CL на сконструированную дисульфидную связь. Раскрытие, связанное с DuetMab, можно найти, например, в патенте США № 9527927 и Mazon, 2015, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит:

(a) модифицированную область CH, где модифицированная тяжелая цепь содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин; и

(b) модифицированную соответствующую область CL, где модифицированная CL содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин,

где либо:

(i) первая тяжелая цепь содержит модифицированную область CH, а первая легкая цепь содержит модифицированную соответствующую область CL; либо

(ii) вторая тяжелая цепь содержит модифицированную область CH, а вторая легкая цепь содержит модифицированную соответствующую область CL.

В некоторых вариантах введенный заменой цистеин модифицированной области CH, полученный в результате замены нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин, и введенный заменой цистеин модифицированной соответствующей области CL, полученный в результате замены нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин, могут образовывать дисульфидную связь.

В некоторых вариантах модифицированная область CH содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин в положении 126; а модифицированная соответствующая область CL содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на цистеин в положении 121, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

В некоторых вариантах модифицированная область СН содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин в положении 126 и замену нативной аминокислоты цистеин на отличную от цистеина аминокислоту в положении 219, например на валин; а модифицированная соответствующая область СL содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на цистеин в положении 121 и замену нативной аминокислоты цистеин на отличную от цистеина аминокислоту в положении 214, например на валин, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

В некоторых вариантах молекула антитела содержит вторую область СН и вторую соответствующую легкую цепь, где вторая область СН и вторая соответствующая СL не содержат замены нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин и не содержат замены нативного цистеина на отличную от цистеина аминокислоту.

Конъюгаты

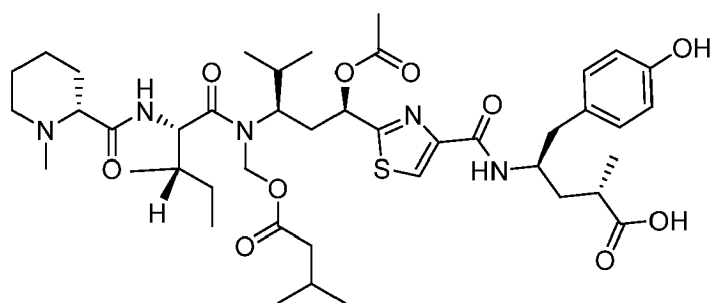
Молекула антитела может быть конъюгирована с лекарственным средством. В данном случае молекула антитела может обозначаться как "конъюгат" или "конъюгат антитело-лекарственное средство". Такие конъюгаты находят применение при лечении и/или диагностике заболеваний, описанных в данном документе. Используемое в данном документе лекарственное средство может называться "полезной нагрузкой" или "поражающим элементом".

В некоторых вариантах лекарственное средство предусматривает цитотоксин, радиоактивный изотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, средство для RNAi, микроРНК, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптозное средство, пептид, липид, углевод, хелатообразующее средство или их комбинации.

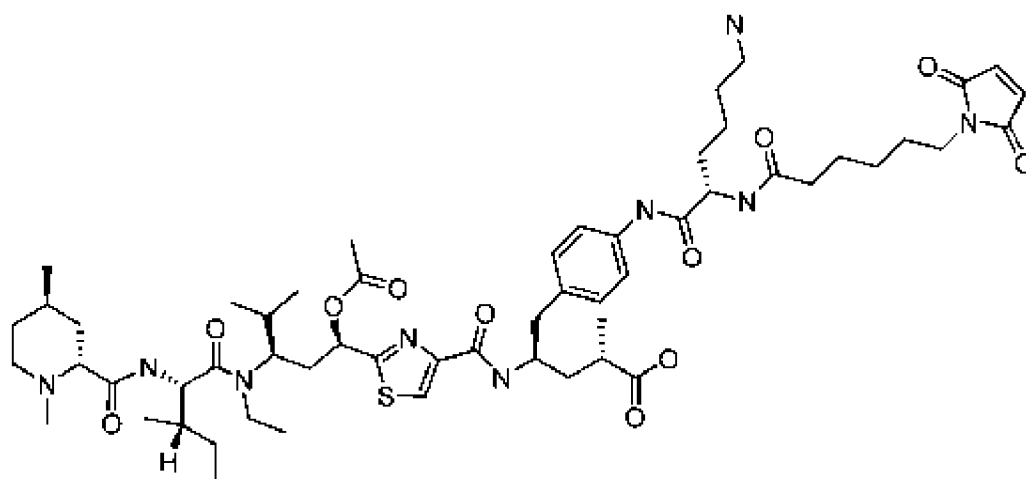
Цитотоксин представляет собой соединение, которое способно вызвать гибель клетки, на которое оно нацеливается. Как правило, в контексте конъюгатов антитело-лекарственное средство цитотоксин доставляется в клетку, на которую нацелена молекула антитела, при этом он высвобождается в клетку и индуцирует гибель клетки. Применение цитотоксинов в конъюгатах антитело-лекарственное средство описано, например, в Chalouni and Doll 2018 J Exp Clin Cancer Res. 37(1):20. В некоторых вариантах цитотоксин представляет собой тубулизин, ауристатин, майтансиноид, ингибитор топоизомеразы или пирролобензодиазепин (PBD).

В конкретных вариантах цитотоксин представляет собой тубулизин или содержит его. Тубулизины представляют собой класс цитостатических тетрапептидов, которые содержат

изолейцин и три другие сложные неприродные аминокислоты Мер (R—N-мепипеколиновую кислоту), Tuv (тубувалин) и Tut (тубулирозин) или Tur (тубуфенилаланин). Тубулизины являются чрезвычайно мощными цитотоксическими молекулами и эффективными против линий клеток с множественной лекарственной резистентностью (Domling, 2005). Данные соединения демонстрируют высокую цитотоксичность при тестировании на панели линий раковых клеток со значениями IC50 в низком пиколярном диапазоне; таким образом, они представляют интерес в качестве противораковых терапевтических средств. См., например, WO2012019123. Конъюгаты с тубулизином раскрыты, например, в патенте США № 7776814. В некоторых вариантах тубулизин представляет собой тубулизин А, имеющий следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах тубулизин представляет собой тубулизин 1508, также называемый "AZ1508", и более подробно описан в WO 2015157594. Тубулизин 1508 имеет следующую химическую структуру:

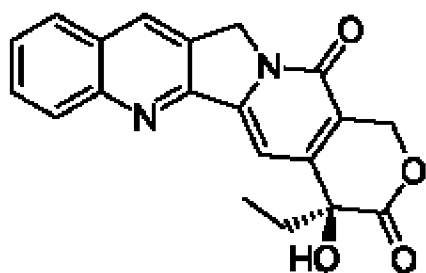


Предпочтительно цитотоксин представляет собой ингибитор топоизомеразы или содержит его. Термин "ингибитор топоизомеразы", используемый в данном документе, относится к цитотоксическому средству, которое ингибирует активность одного или нескольких из топоизомеразных ферментов (топоизомеразы I и II), которые представляют собой ферменты, играющие важную роль в репликации и транскрипции ДНК за счет

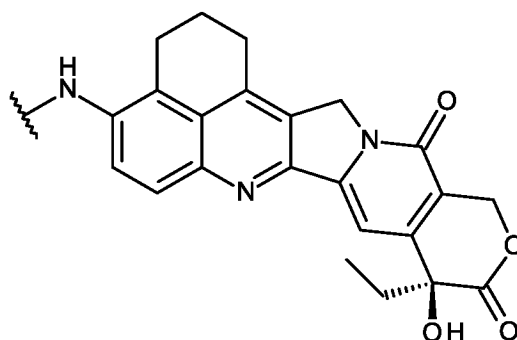
регулирования сверхспирализации ДНК. Следовательно, ожидается, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие ингибитор топоизомеразы в качестве цитотоксина, будут препятствовать нормальным процессам с участием ДНК, что, следовательно, приведет к гибели клетки. В клинических испытаниях было продемонстрировано, что конъюгаты, содержащие ингибиторы топоизомеразы, являются эффективными против различных линий клеток, содержащихся в опухолях, а также обладают противораковой активностью. См., например, Ogitani, 2016a, Ogitani, 2016b, Cardillo, 2015, и Bardia, 2017.

Предпочтительно, чтобы молекула антитела была конъюгирована с ингибитором топоизомеразы I. Репрезентативные примеры ингибиторов топоизомеразы I включают без ограничения камптотецины и их аналоги, представляющие собой топотекан, иринотекан, белотекан, экзатекан, луротекан и синотекан. Репрезентативные примеры ингибиторов топоизомеразы II включают без ограничения амсакрин, даунорубин, доксорубин, эпиподофиллотоксины, эллиптицины, эпирубин, этопозид, разоксан и тенипозид.

Пример химической структуры камптотецина является следующим:



Общий пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением:



A*

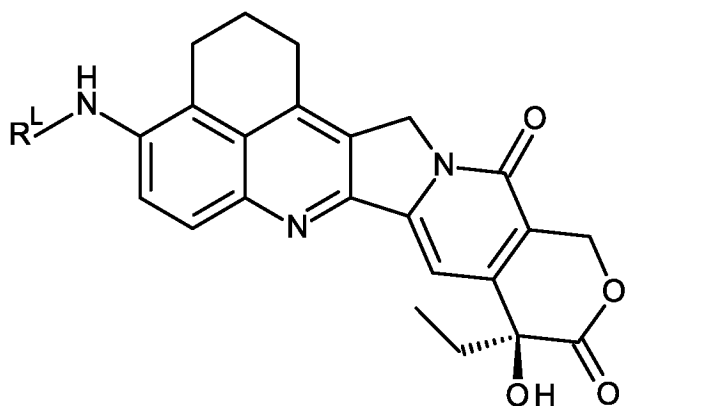
Указанное соединение обозначено как A*.

Соединение (например, A*) предпочтительно снабжено линкером для соединения (предпочтительно конъюгирования) с молекулой антитела, описанной в данном документе (которая может называться "лигандное звено" или в качестве альтернативы "связывающееся с клеткой средство" (СВА)). Соответственно, линкер присоединен

(например, конъюгирован) с возможностью расщепления к аминокислотному остатку, например, аминокислоте молекулы антитела, описанной в данном документе.

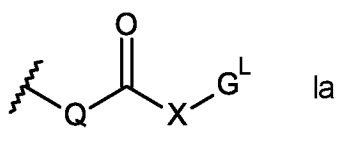
Конструкция и выбор линкеров для применения в конъюгатах известны из уровня техники и описаны, например, в Beck, 2017. Используемый в данном документе линкер может представлять собой любой из линкеров, описанных в Beck, 2017.

Более конкретно, пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением с формулой "I":



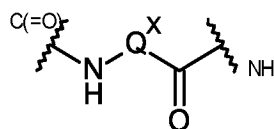
и его соли и сольваты, где R^L представляет собой линкер для соединения с молекулой антитела, описанной в данном документе, где указанный линкер предпочтительно выбран из:

(ia):



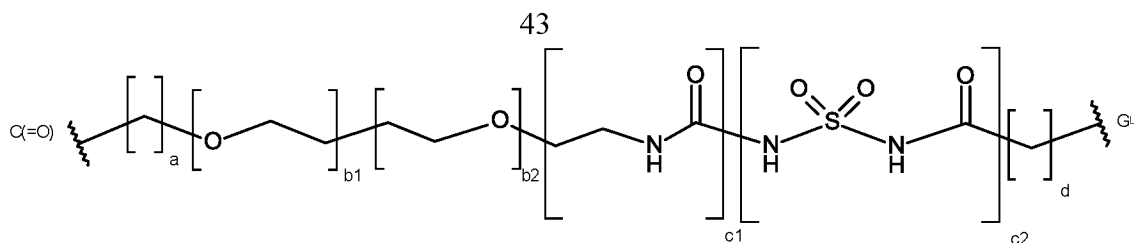
где

Q представляет собой:



, где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

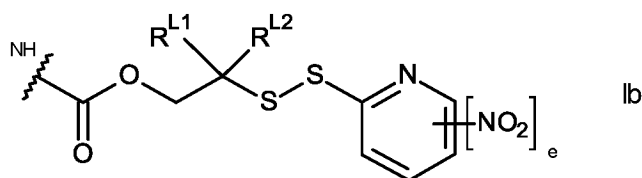
X представляет собой:



где a составляет 0-5, b_1 составляет 0-16, b_2 составляет 0-16, c_1 равняется 0 или 1, c_2 равняется 0 или 1, d составляет 0-5, где по меньшей мере b_1 или b_2 равняется 0 (т. е. только один из b_1 и b_2 может не быть 0), и по меньшей мере c_1 или c_2 равняется 0 (т. е. только один из c_1 и c_2 может не быть 0);

G^L представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, лигандным звеном или связывающимся с клеткой средством); или

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e составляет 0 или 1.

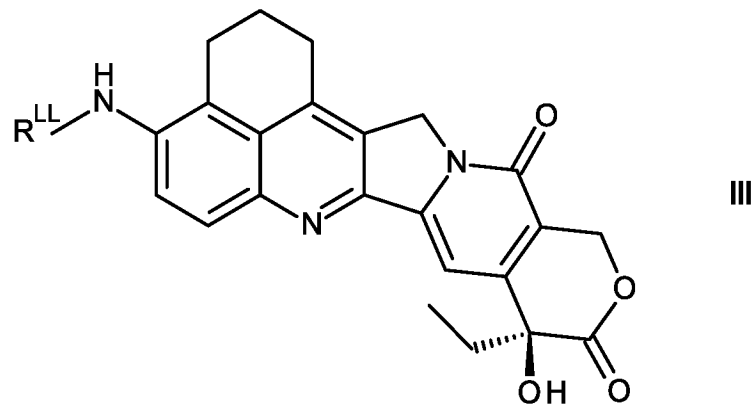
Специалисту в данной области техники будет понятно, что с молекулой антитела может быть конъюгировано более одного из указанных средств (например, ингибитор топоизомеразы I).

Например, конъюгат (например, конъюгат антитело-лекарственное средство) по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат с общей формулой IV,



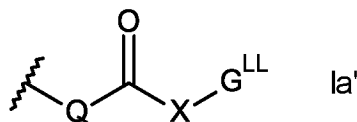
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой молекулу антитела, описанную в данном документе (например, лигандное звено или СВА), D^L представляет собой лекарственное средство с линкером (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер), а p представляет собой целое число от 1 до 20.

Предпочтительно D^L представляет собой ингибитор топоизомеразы I с линкером, характеризующийся формулой III:



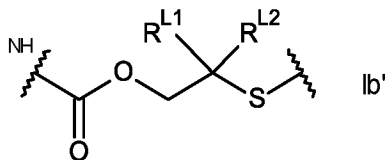
R^{LL} представляет собой линкер, соединенный с молекулой антитела, описанной в данном документе (например, лигандным звеном), где линкер предпочтительно выбран из:

(ia'):



где Q и X являются такими, как определено выше, и G^{LL} представляет собой линкер, соединенный с молекулой антитела, описанной в данном документе (например, лигандным звеном или CBA); и

(ib'):



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено выше.

Нагрузка лекарственным средством представлена с помощью p , числа ингибитора(-ов) топоизомеразы I (например, звеньев, представляющих собой лекарственное средство) на молекулу антитела (например, лигандное звено). Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 звеньев, представляющих собой лекарственное средство (D), на лигандное звено. В случае композиций p представляет собой среднюю нагрузку лекарственным средством для конъюгатов в композиции, и p находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах, когда лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы, диапазон p выбран из 2-8, предпочтительно 4-8, даже более предпочтительно 5-7, еще более предпочтительно 5,5-6,5. Как описано в примерах, ADC, содержащий ингибитор топоизомеразы I SG3932, получали со средним DAR, составляющим $6 \pm 6\%$.

Соответственно, настоящее изобретение охватывает конъюгат, содержащий молекулу антитела, описанную в данном документе (например лигандное звено или СВА), ковалентно связанную с по меньшей мере одним ингибитором топоизомеразы I (например, звеном, представляющим собой лекарственное средство, таким как А*, которое проиллюстрировано выше). Указанный ингибитор предпочтительно связан с молекулой антитела посредством линкера (например, линкерного звена), такого как линкер, описанный выше как R^L и/или R^{LL}. Другими словами, настоящее изобретение охватывает молекулу антитела, описанную в данном документе (например, лигандное звено или СВА), с одним или несколькими ингибиторами топоизомеразы I, предпочтительно присоединенными посредством линкера (например звенья, представляющие собой лекарственное средство-линкер). Молекула антитела (представляющая лигандное звено или СВА), более подробно описанная выше, представляет собой нацеливающее средство, которое связывается с фрагментом-мишенью. Более конкретно данная молекула антитела, например, может специфически связываться с EGFR и cMET на клетке-мишени, к которой таким образом доставляется звено, представляющее собой лекарственное средство. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения, например, различных форм рака и других нарушений с помощью ADC (например, форм рака/нарушений, которые ассоциированы с присутствием клеток, предпочтительно раковых клеток, которые экспрессируют EGFR и cMET). Такие способы более подробно описаны ниже.

Некоторые признаки ингибиторов топоизомеразы I, описанных выше, являются особенно предпочтительными и могут быть определены более подробно, как изложено ниже. В качестве примера будет приведен предпочтительный вариант признака Q^x (например, в пределах линкера 1a, описанного выше).

Следующие предпочтения можно применять ко всем аспектам настоящего изобретения, которые описаны выше, или они могут относиться к отдельному аспекту. Предпочтения могут быть объединены вместе в любой комбинации.

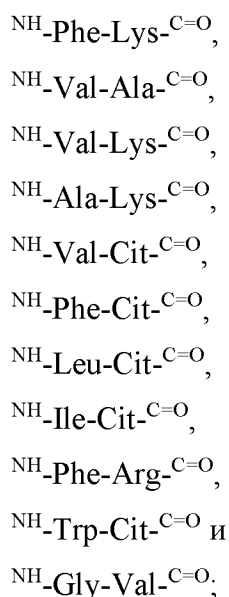
Q^x

В одном варианте Q представляет собой аминокислотный остаток. Аминокислота может представлять собой природную аминокислоту или неприродную аминокислоту. Например, Q может быть выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

В одном варианте Q предусматривает дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах дипептид содержит природные

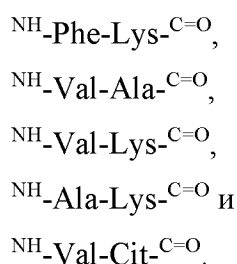
аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, расщепляемый катепсином, то дипептид является сайтом осуществления катепсин-опосредованного расщепления. Тогда дипептид является сайтом распознавания для катепсина.

В одном варианте Q выбран из:



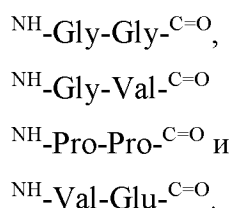
где Cit представляет собой цитруллин.

Предпочтительно Q выбран из:



Более предпочтительно Q выбран из NH-Phe-Lys-C=O , NH-Val-Cit-C=O или NH-Val-Ala-C=O .

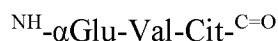
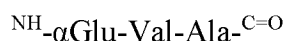
Другие подходящие комбинации дипептидов включают



Можно использовать другие дипептидные комбинации, в том числе комбинации, описанные в Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах Q представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, расщепляемый катепсином, то

трипептид является сайтом осуществления катепсин-опосредованного расщепления. Тогда трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Трипептидными линкерами, представляющими особый интерес, являются:



В некоторых вариантах Q представляет собой тетрапептидный остаток. Аминокислоты в тетрапептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах тетрапептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, расщепляемый катепсином, то тетрапептид является сайтом осуществления катепсин-опосредованного расщепления. Тогда тетрапептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Тетрапептидными линкерами, представляющими особый интерес, являются:

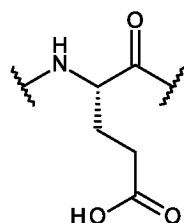


В некоторых вариантах тетрапептид представляет собой

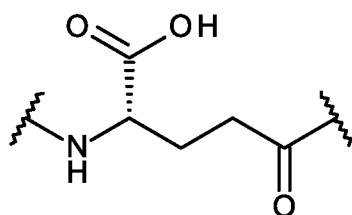


На представленных выше изображениях пептидных остатков NH- представляет N-конец, и -C=O представляет C-конец остатка. C-конец связан с NH из A*.

Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты, т. е.



αGlu представляет остаток глутаминовой кислоты, когда он связан посредством α -цепи, т. е.:



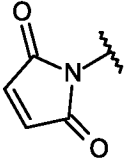
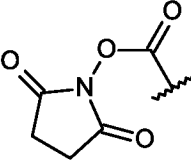
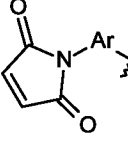

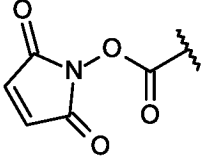

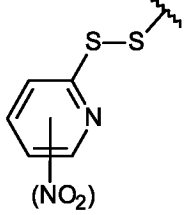

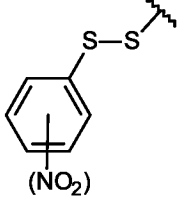
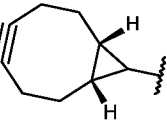
В одном варианте, при необходимости, боковая цепь аминокислоты является химически защищенной. Защитная группа для боковой цепи может представлять собой

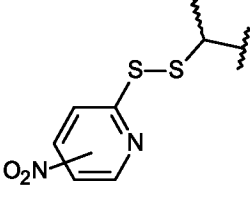
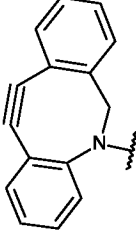
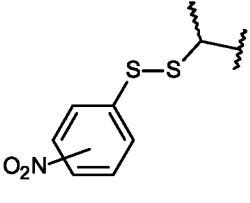
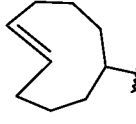
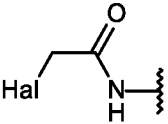
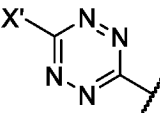
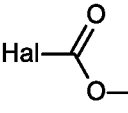
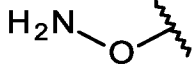
группу, обсуждаемую выше. Защищенные аминокислотные последовательности могут расщепляться с помощью ферментов. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с защитной группой боковой цепи Boc, может расщепляться с помощью катепсина.

Защитные группы для боковых цепей аминокислот широко известны из уровня техники и описаны в каталоге Novabiochem, и они являются такими, как описано выше.

G^L

G^L может быть выбран из:

(G ^{L1-1})		(G ^{L6})	
(G ^{L1-2})		(G ^{L7})	
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-1})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L9})	
(G ^{L3-2})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L10})	

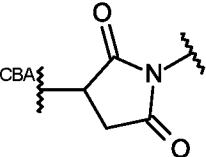
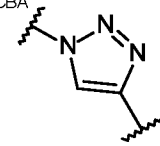
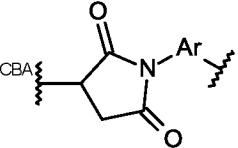
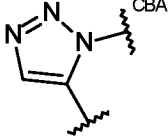
(G ^{L3-3})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 <p>где Hal представляет собой I, Br, Cl</p>	(G ^{L13})	
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

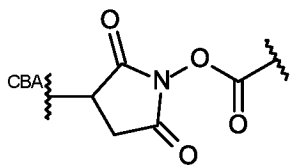
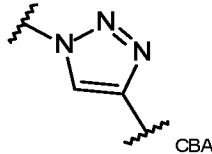
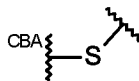
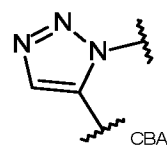
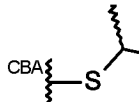
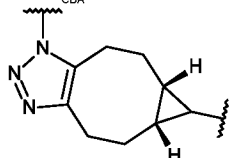
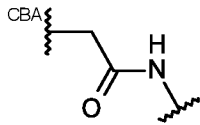
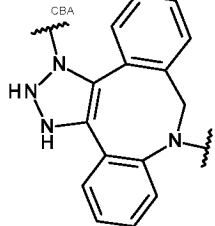
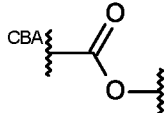
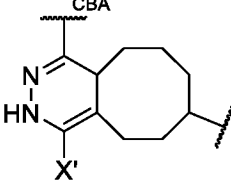
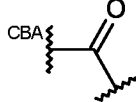
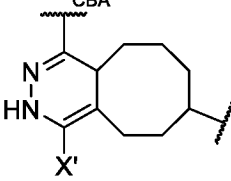
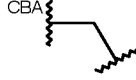
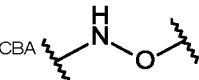
где Ar представляет C₅₋₆-ариленовую группу, например фенилен, а X' представляет C₁-алкил.

В некоторых вариантах G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}. В некоторых из данных вариантов G^L представляет собой G^{L1-1}.

G^{LL}

G^{LL} может быть выбран из:

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	

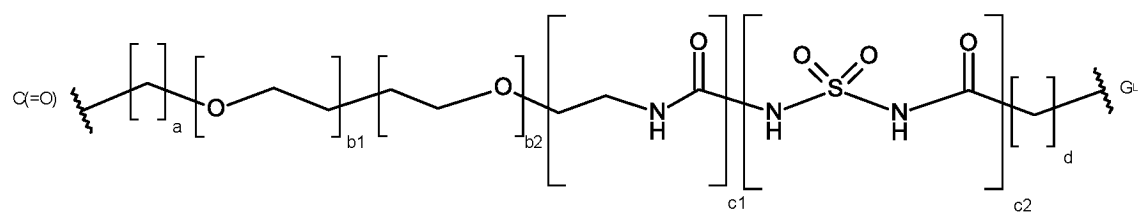
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL-4})		(G ^{LL11})	
(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

где Ar представляет C₅₋₆-ариленовую группу, например фенилен, а X' представляет C₁-алкил. CBA представляет средство, связывающееся с клеткой, или лигандное звено.

В некоторых вариантах G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}. В некоторых из данных вариантов G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

X

X предпочтительно представляет собой:



где a составляет 0-5, b_1 составляет 0-16, b_2 составляет 0-16, c равняется 0 или 1, d составляет 0-5, где по меньшей мере b_1 или b_2 равняется 0, и по меньшей мере c_1 или c_2 равняется 0.

a может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах a составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов a составляет 0 или 1. В дополнительных вариантах a составляет 0.

b_1 может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах b_1 составляет 0-12. В некоторых из данных вариантов b_1 составляет 0-8 и может составлять 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b_2 может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах b_2 составляет 0-12. В некоторых из данных вариантов b_2 составляет 0-8 и может составлять 0, 2, 3, 4, 5 или 8. Предпочтительно только один из b_1 и b_2 может не быть 0.

c_1 может составлять 0 или 1. c_2 может составлять 0 или 1. Предпочтительно только один из c_1 и c_2 может не быть 0.

d может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах d составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов d составляет 1 или 2. В дополнительных вариантах d составляет 2. В дополнительных вариантах d составляет 5.

В некоторых вариантах X a составляет 0, b_1 составляет 0, c_1 составляет 1, c_2 составляет 0, и d составляет 2, а b_2 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b_2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X a составляет 1, b_2 составляет 0, c_1 составляет 0, c_2 составляет 0, и d составляет 0, а b_1 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b_1 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X a составляет 0, b_1 составляет 0, c_1 составляет 0, c_2 составляет 0, и d составляет 1, а b_2 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b_2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X b_1 составляет 0, b_2 составляет 0, c_1 составляет 0, c_2 составляет 0, а один из a и d составляет 0. Другой из a и d составляет от 1 до 5. В некоторых из данных вариантов другой из a и d составляет 1. В других из данных вариантов другой из a и d составляет 5. В некоторых вариантах X a составляет 1, b_2 составляет 0, c_1 составляет 0, c_2 составляет 1, d составляет 2, а b_1 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b_2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах R^L представлен формулой Ib. В некоторых вариантах R^{LL} представлен формулой Ib'.

R^{L1} и R^{L2} могут быть независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

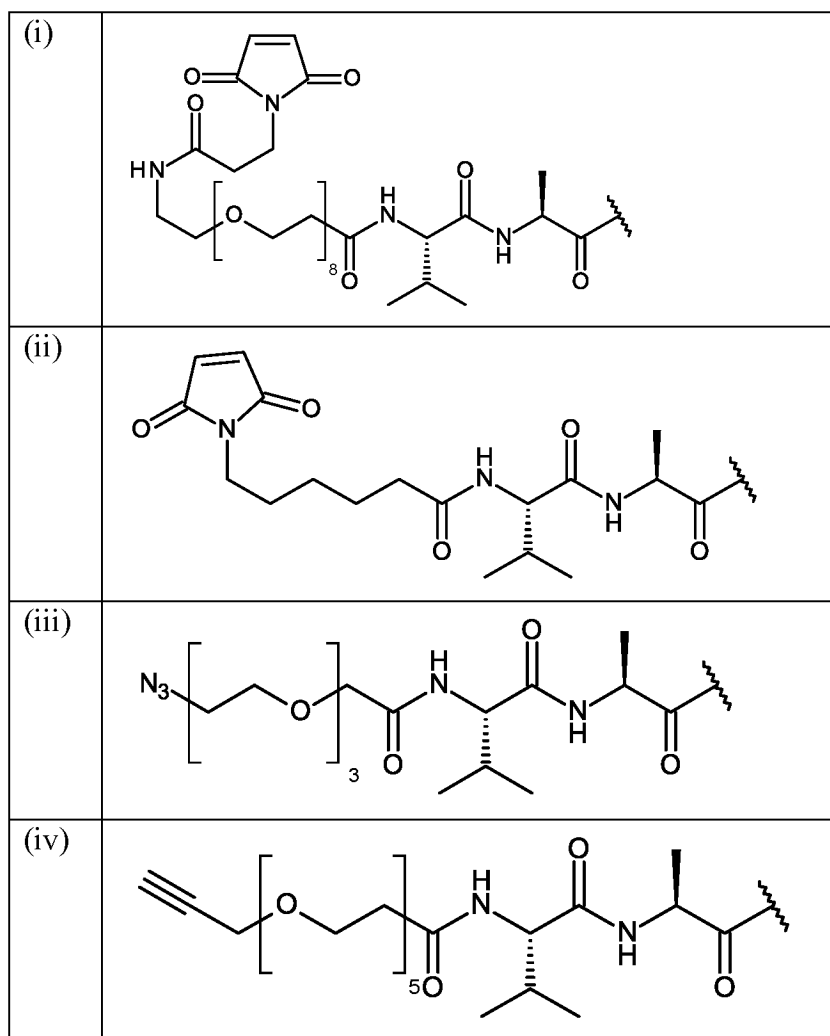
В некоторых вариантах как RL1, так и RL2 представляют собой H. В некоторых вариантах RL1 представляет собой H, а RL2 представляет собой метил. В некоторых вариантах как RL1, так и RL2 представляют собой метил.

В некоторых вариантах RL1 и RL2 вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу. В некоторых вариантах RL1 и RL2 вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

В группе Ib в некоторых вариантах e составляет 0. В других вариантах e составляет 1, и нитрогруппа может находиться в любом доступном положении кольца. В некоторых из данных вариантов она находится в орто-положении. В других из данных вариантов она находится в пара-положении.

В некоторых вариантах, где описанные в данном документе соединения представлены в виде отдельного энантиомера или в энантимерно обогащенной форме, энантимерно обогащенная форма характеризуется соотношением энантиомеров, превышающим 60:40, 70:30; 80:20 или 90:10. В дополнительных вариантах соотношение энантиомеров превышает 95:5, 97:3 или 99:1.

В некоторых вариантах R^L выбран из:

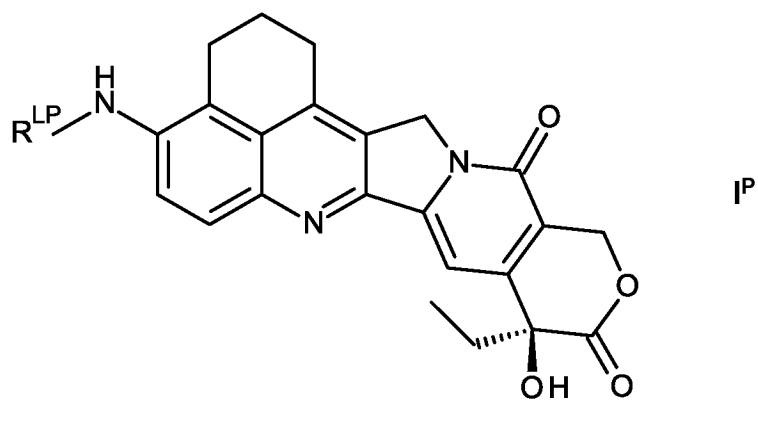


(v)	
(vi)	
(vii)	
(viii)	
(ix)	

В некоторых вариантах R^{LL} представляет собой группу, полученную из указанных выше групп R^L .

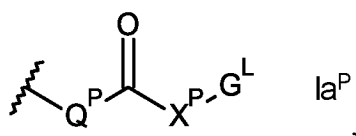
Учитывая приведенные вышеуказанные предпочтения, далее будут описаны определенные предпочтительные формулы топоизомеразы I-линкер (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер).

В некоторых вариантах соединение формулы I представляет собой соединение формулы I^P:



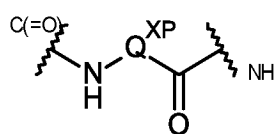
и его соли и сольваты, где R^{LP} представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из:

(ia):



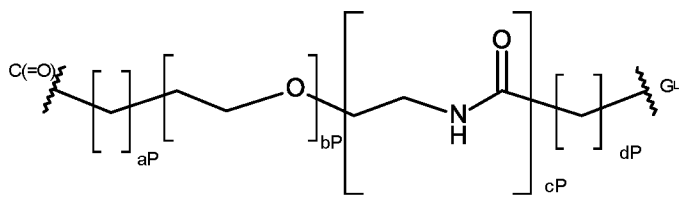
где

Q^P представляет собой:



, где Q^{XP} является таким, что Q^P представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

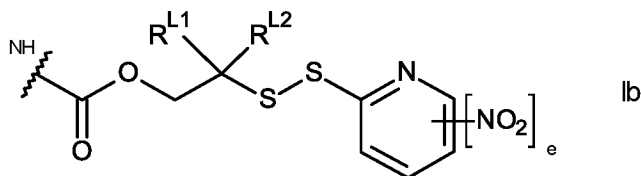
X^P представляет собой:



где a^P составляет 0-5, b^P составляет 0-16, c^P равняется 0 или 1, d^P составляет 0-5;

G^L представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, лигандным звеном);

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e составляет 0 или 1.

aP может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах aP составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов aP составляет 0 или 1. В дополнительных вариантах aP составляет 0.

bP может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах b составляет 0-12. В некоторых из данных вариантов bP составляет 0-8 и может составлять 0, 2, 4 или 8.

cP может составлять 0 или 1.

dP может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах dP составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов dP составляет 1 или 2. В дополнительных вариантах dP составляет 2.

В некоторых вариантах X^P aP составляет 0, cP составляет 1, и dP составляет 2, а bP может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов bP составляет 0, 4 или 8.

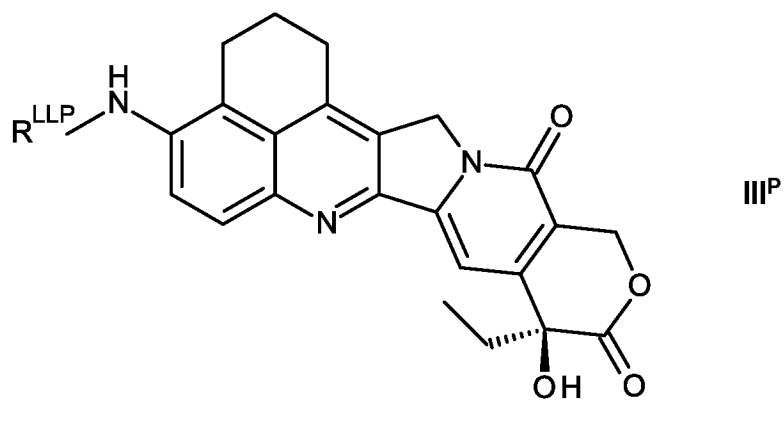
Предпочтения, касающиеся Q^X , указанного выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении Q^{XP} (например, при необходимости).

Предпочтения, касающиеся G^L , R^{L1} , R^{L2} и e , указанных выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении соединений формулы **I^P**.

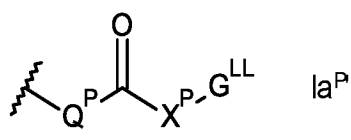
В некоторых вариантах конъюгат формулы **IV** представляет собой конъюгат формулы **IV^P**:



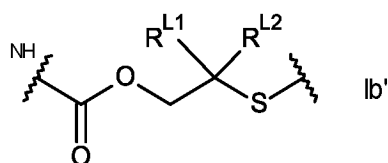
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, лигандное звено), D^{LP} представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер) формулы **III^P**:



R^{LLP} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, лигандным звеном), где указанный линкер выбран из (ia'):

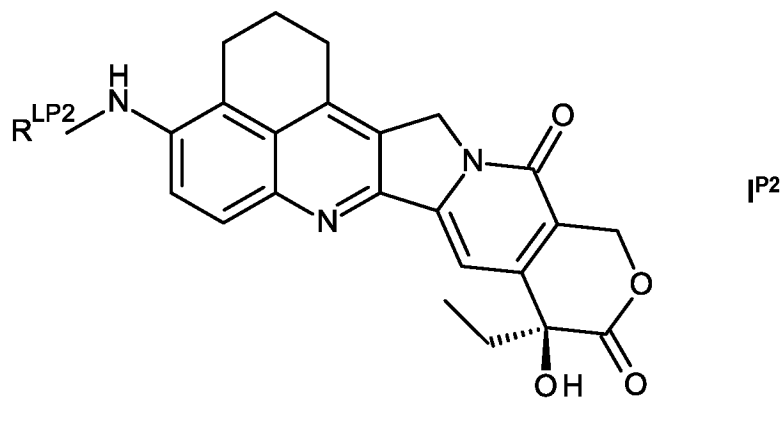


где Q^P и X^P являются такими, как определено выше, и G^{LL} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, лигандным звеном); и (ib'):



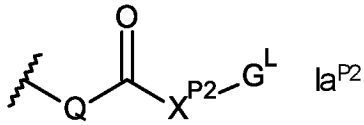
где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено выше; и r представляет собой целое число от 1 до 20.

В некоторых вариантах соединение формулы I представляет собой соединение формулы I^{P2}:



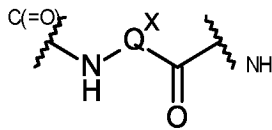
и его соли и сольваты, где R^{LP2} представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из:

(ia):



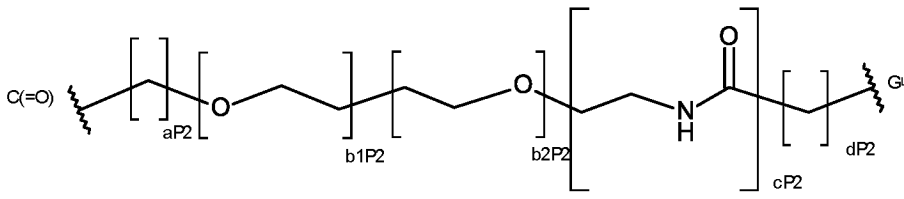
где

Q представляет собой:



, где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

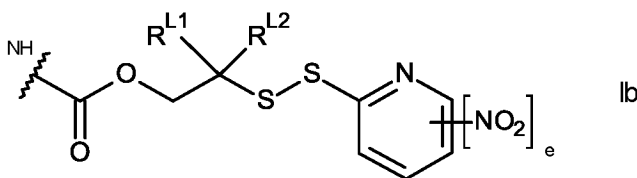
X^{P2} представляет собой:



где $aP2$ составляет 0-5, $b1P2$ составляет 0-16, $b2P2$ составляет 0-16, $cP2$ равняется 0 или 1, $dP2$ составляет 0-5, где по меньшей мере $b1P2$ или $b2P2$ равняется 0 (т. е. только один из $b1$ и $b2$ может не быть 0);

G^L представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, лигандным звеном);

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e составляет 0 или 1.

aP2 может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах aP2 составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов aP2 составляет 0 или 1. В дополнительных вариантах aP2 составляет 0.

b1P2 может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах b1P2 составляет 0-12. В некоторых из данных вариантов b1P2 составляет 0-8 и может составлять 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b2P2 может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах b2P2 составляет 0-12. В некоторых из данных вариантов b2P2 составляет 0-8 и может составлять 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

Предпочтительно только один из b1P2 и b2P2 может не быть 0.

cP2 может составлять 0 или 1.

dP2 может составлять 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах dP2 составляет 0-3. В некоторых из данных вариантов dP2 составляет 1 или 2. В дополнительных вариантах dP2 составляет 2. В дополнительных вариантах dP2 составляет 5.

В некоторых вариантах X^{P2} aP2 составляет 0, b1P2 составляет 0, cP2 составляет 1, и dP2 составляет 2, а b2P2 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b2P2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X^{P2} aP2 составляет 1, b2P2 составляет 0, cP2 составляет 0, и dP2 составляет 0, а b1P2 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b1P2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X^{P2} aP2 составляет 0, b1P2 составляет 0, cP2 составляет 0, и dP2 составляет 1, а b2P2 может составлять от 0 до 8. В некоторых из данных вариантов b2P2 составляет 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах X^{P2} b1P2 составляет 0, b2P2 составляет 0, cP2 составляет 0, и один из aP2 и dP2 составляет 0. Другой из aP2 и d составляет 1-5. В некоторых из данных вариантов другой из aP2 и d составляет 1. В других из данных вариантов другой из aP2 и dP2 составляет 5.

Предпочтения, касающиеся Q^X, указанного выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении Q^X в формуле Ia^{P2} (например, при необходимости).

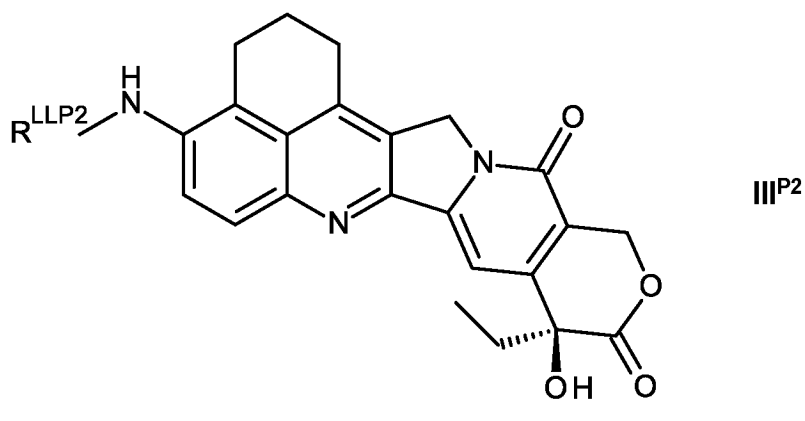
Предпочтения, касающиеся G^L, R^{L1}, R^{L2} и e, указанных выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении соединений формулы I^{P2}.

В некоторых вариантах конъюгат формулы IV представляет собой конъюгат формулы IV^{P2}:

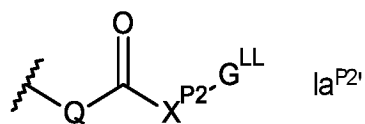


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе

(например, лигандное звено), D^{LP2} представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер) формулы III^{P2}:

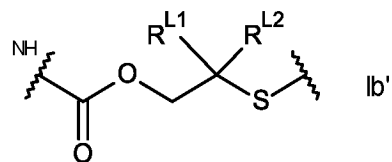


R^{LLP2} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, лигандным звеном), где указанный линкер выбран из (ia'):



где Q и X^{P2} являются такими, как определено выше, и G^{LL} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; и

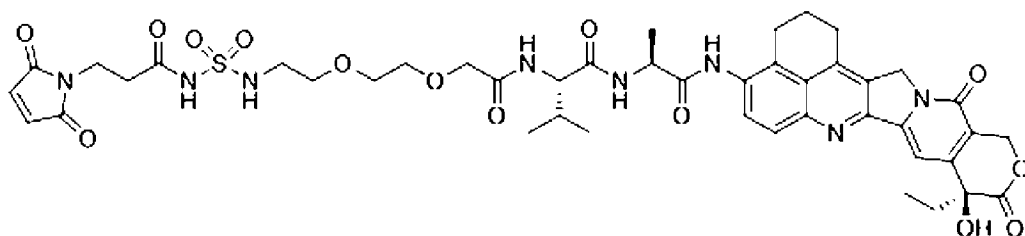
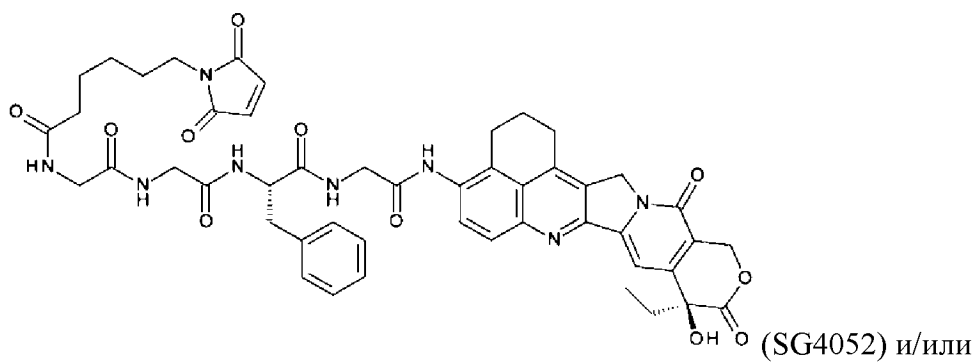
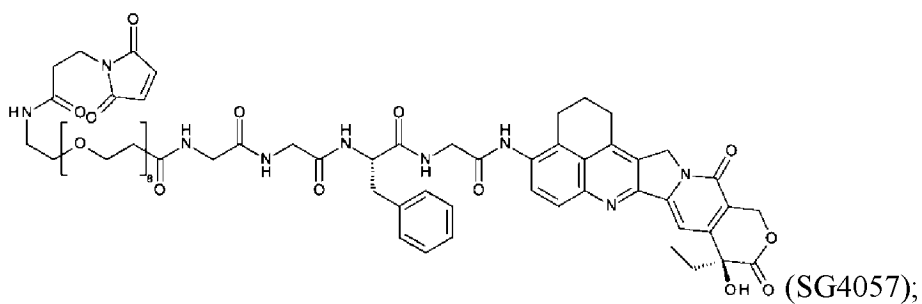
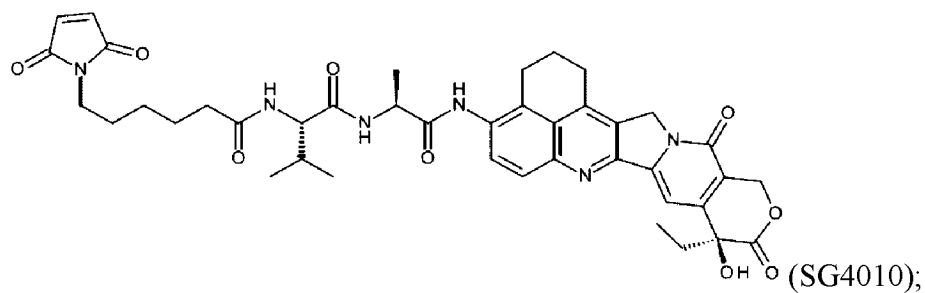
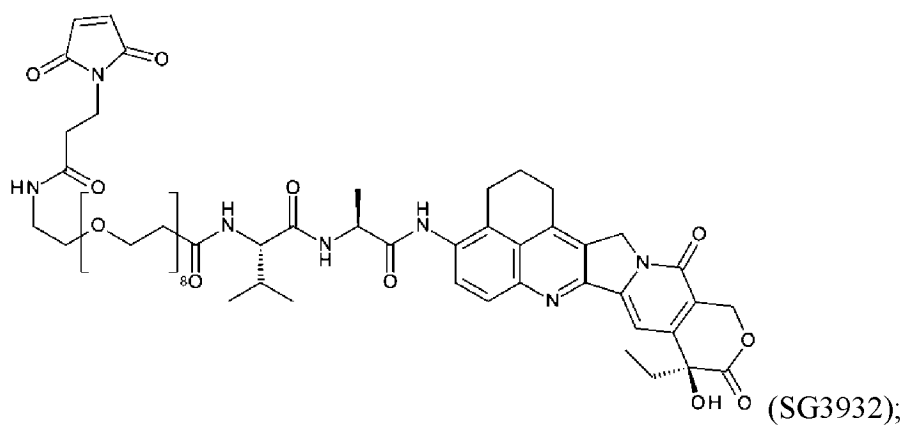
(ib'):



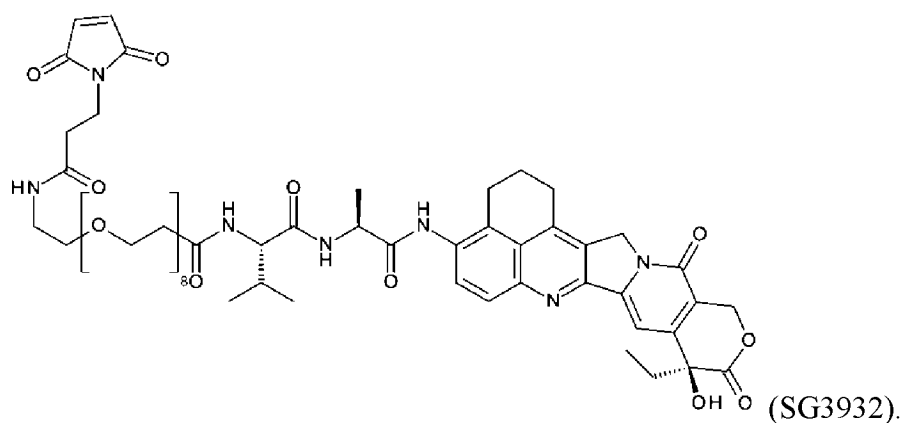
где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено выше; и

r представляет собой целое число от 1 до 20.

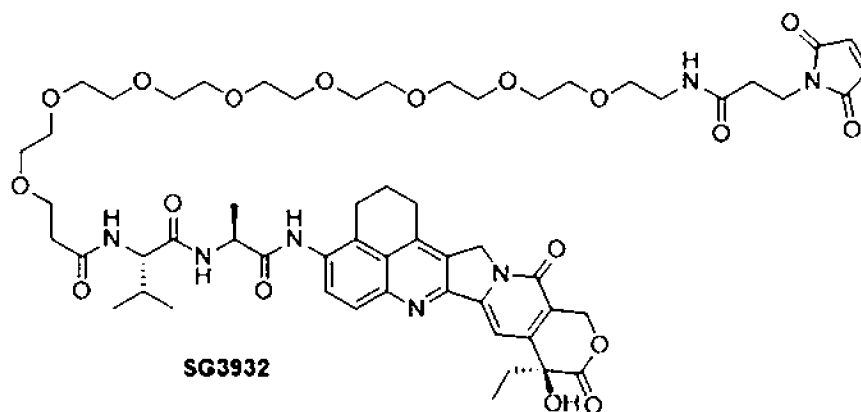
Особенно подходящие ингибиторы топоизомеразы I включают те, которые характеризуются следующими формулами:



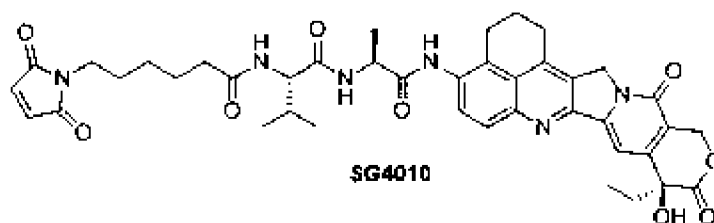
SG3932 является особенно предпочтительным. Таким образом, в предпочтительном варианте молекула антитела, описанная в данном документе, конъюгирована с ингибитором топоизомеразы I, имеющим следующую формулу (например, SG3932):



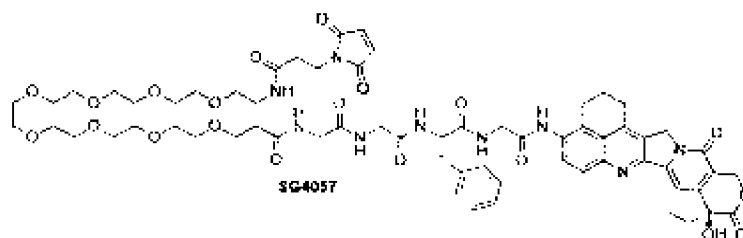
Во избежание неоднозначности толкования, цифра '8' указывает на то, что структура внутри квадратных скобок повторяется восемь раз. Таким образом, другое изображение SG3932 представляет собой:



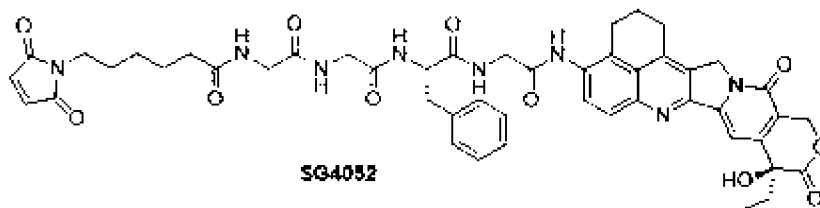
Другое изображение SG4010 представляет собой:



Другое изображение SG4057 представляет собой:



Другое изображение SG4052 представляет собой:

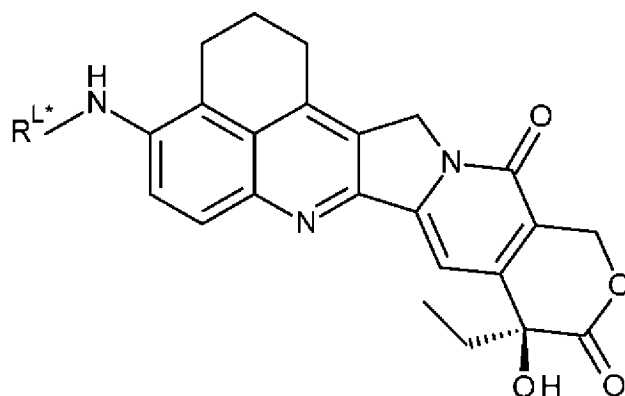


Любые антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно конъюгировать с одним или несколькими из указанных ингибиторов топоизомеразы I.

Синтез ингибиторов топоизомеразы I

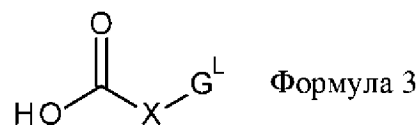
Для завершенности далее будут описаны определенные общие пути синтеза для получения предпочтительного(-ых) ингибитора(-ов) топоизомеразы I.

Соединения формулы I, где R^L представлен формулой Ia, могут быть синтезированы из соединения формулы 2:



Формула 2

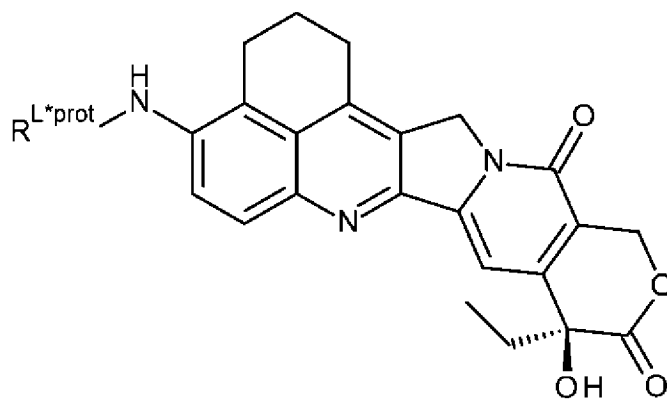
где R^{L*} представляет собой –QH, за счет присоединения к соединению формулы 3:



или его активированной версии.

Такую реакцию можно осуществлять в условиях, способствующих образованию амидной связи.

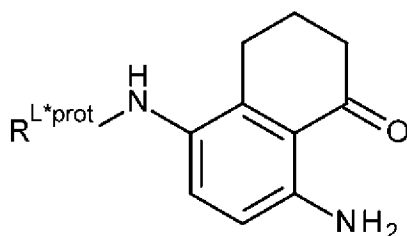
Соединения формулы 2 можно синтезировать посредством удаления защитной группы из соединения формулы 4:



Формула 4

где R^{L*prot} представляет собой $-Q-Prot^N$, где $Prot^N$ представляет собой защитную группу для аминогруппы.

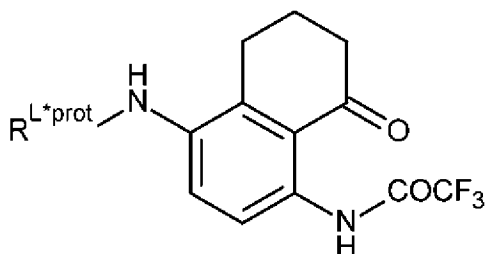
Соединения формулы 4 могут быть синтезированы посредством реакции сочетания соединения формулы 5:



Формула 5

с соединением АЗ с применением реакции Фридлендера.

Соединения формулы 5 можно синтезировать из соединений формулы 6:



Формула 6

посредством удаления трифторацетамидной защитной группы.

Соединения формулы 6 можно синтезировать посредством реакции сочетания $R^{L*prot}-OH$ с соединением I7.

Соединения формулы I, где R^L представлен формулой Ia или Ib, можно синтезировать из соединения II1 посредством реакции сочетания с соединением R^L-OH или его активированной формой.

Защитные группы для аминогруппы

Защитные группы для аминогруппы широко известны специалистам в данной области техники. Особое внимание обращается на раскрытие подходящих защитных групп в Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, четвертое издание, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), страницы 696–871.

Нагрузка лекарственным средством (p) представляет собой среднее число лекарственного средства (например, тубулизина или ингибитора топоизомеразы) на молекулу антитела. В композициях по настоящему изобретению нагрузка лекарственным средством находится в диапазоне от 1 до 20 лекарственных средств (D) на молекулу антитела. Например, нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 10 лекарственных средств (D) на молекулу антитела, т. е. когда 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лекарственных средств ковалентно присоединены к молекуле антитела. Композиции конъюгатов включают наборы молекул антител, конъюгированных с лекарственными средствами, находящимися в диапазоне от 1 до 10. Если соединения по настоящему изобретению связаны с лизинами, нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 80 лекарственных средств (D) на молекулу антитела, хотя может быть предпочтительным верхний предел, составляющий 40, 20, 10 или 8. Композиции конъюгатов включают наборы молекул антител, конъюгированных с лекарственными средствами, находящимися в диапазоне от 1 до 80, от 1 до 40, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 8.

Среднее число лекарственных средств на антитело в препаратах на основе конъюгатов, полученных посредством реакций конъюгации, может быть охарактеризовано с помощью традиционных способов, таких как использование UV, обращенно-фазовая HPLC, НИС, масс-спектрометрия, анализ методом ELISA и электрофорез. Также можно определять количественное распределение конъюгатов с точки зрения p . Посредством ELISA можно определять усредненное значение p в конкретном препарате на основе конъюгатов (Hamblett, 2004; Sanderson, 2005). Однако распределение значений p (лекарственного средства) не отчетливо выражено из-за связывания антитела с антигеном и предела обнаружения ELISA. Кроме того, анализ методом ELISA для обнаружения конъюгатов не позволяет определить, в каком месте к молекуле антитела присоединены фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, такое как фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи или конкретные аминокислотные остатки. В некоторых вариантах разделение, очистку и определение характеристик гомогенных конъюгатов, где p представляет собой определенное значение, полученное для конъюгатов с нагрузками другим лекарственным средством, можно осуществлять посредством таких способов, как обращенно-фазовая HPLC или электрофорез. Такие методики также применимы в отношении других типов конъюгатов.

Для некоторых конъюгатов значение p может ограничиваться числом сайтов присоединения на молекуле антитела. Например, молекула антитела может содержать лишь одну или несколько тиольных групп цистеина или может содержать лишь одну или

несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, через которые может быть присоединен линкер.

Как правило, во время реакции конъюгации с молекулой антитела конъюгируется меньшее число лекарственного средства, чем теоретический максимум. Молекула антитела может содержать, например, множество остатков лизина, которые не вступают в реакцию с линкером (L). Только наиболее реакционноспособные группы лизина способны реагировать с линкерным реагентом, реакционноспособным в отношении амина. Кроме того, только наиболее реакционноспособные тиольные группы цистеина способны реагировать с линкерным реагентом, реакционноспособным в отношении тиола. Обычно молекулы антител не содержат множество, если они имеются, свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство. Большинство тиольных остатков цистеина в молекулах антител конъюгатов существуют в виде дисульфидных мостиков, и должны быть восстановлены с помощью восстанавливающего средства, такого как дитиотреитол (DTT) или TCEP, в частично или полностью восстанавливающих условиях. Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) конъюгатов можно регулировать несколькими разными способами, включая: (i) ограничение молярного избытка линкера-лекарственного средства по отношению к антителу, (ii) ограничение времени или температуры протекания реакции конъюгации и (iii) частичные или ограничивающие восстанавливающие условия для модификации тиольной группы цистеина.

Определенные молекулы антител содержат восстанавливаемые межцепочечные дисульфидные связи, т. е. цистеиновые мостики. Молекулы антител можно сделать реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами посредством обработки восстанавливающим средством, таким как DTT (дитиотреитол). Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически будет образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Данный процесс также называется "классической конъюгацией" и отличается от таких способов, при которых конъюгация происходит по цистеину, который был сконструирован в специфическом сайте молекулы антитела. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитела посредством осуществления реакции остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота), приводящей к превращению амина в тиол.

ADC с лекарственными средствами, случайным образом конъюгированными с нативными остатками цистеина, получают с помощью классической конъюгации путем частичного восстановления антитела с последующей реакцией с требуемым комплексом

линкер-лекарственное средство. Например, антитело в концентрации 5 мг/мл может быть частично восстановлено путем добавления приблизительно 3 молярных эквивалентов DTT при pH 8,0 с последующей инкубацией при температуре приблизительно 37°C в течение приблизительно 2 часов. Затем смесь реакции восстановления можно охладить льдом и избыток DTT удалить, например, посредством диафильтрации. Затем можно добавлять линкер-лекарственное средство до достижения молярного соотношения линкер-лекарственное средство/тиольная группа, составляющего приблизительно 1:10. Реакцию конъюгации можно проводить в присутствии ~10 об. % DMSO. После конъюгации можно добавлять избыток свободного цистеина (приблизительно 2-кратное молярное соотношение относительно линкера-лекарственного средства) для гашения непрореагировавшего линкера-лекарственного средства с получением аддукта цистеин-линкер-лекарственное средство. Затем реакционную смесь можно очистить (например, посредством хроматографии гидрофобных взаимодействий) и подвергнуть замене буфера на PBS. Распределение нагрузки лекарственным средством можно определять с использованием стандартных способов, таких как хроматография гидрофобных взаимодействий и восстановительная обращенно-фазовая хроматография, как описано в других разделах данного документа.

Известны способы получения конъюгатов с применением прямой конъюгации по доступным для растворителя тиолам, образующимся при восстановлении межцепочечных дисульфидных мостиков молекулы антитела с участием N-алкилмалеимида. С помощью других способов лекарственное средство конъюгируют по первичным аминам лизина с применением сложного N-гидроксисукцинимидного эфира. Обзор таких способов представлен, например, в Gébleux and Casi, *Pharmacol Ther* (2016) 167: 48-59, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Отдельно или в качестве дополнения к классическим способам конъюгации, описанным выше, также можно применять сайт-специфическую конъюгацию - способ, при котором контролируют нагрузку лекарственным средством и сайт конъюгации. Этого можно достичь, например, путем конструирования цистеинов в специфических остатках, замены остатков неприродными аминокислотами с помощью биоортогональных реакций или подходов ферментативного лигирования. Один способ сайт-специфической конъюгации описан в Dimasi, 2017, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, и предусматривает вставку цистеинов в молекулы антител в конкретных положениях.

Аминокислоты, представляющие собой цистеин, могут быть сконструированы в реакционноспособных сайтах молекулы антитела, а также таким образом, чтобы они не

образовывали внутрицепочечных или межмолекулярных дисульфидных связей (Junutula, 2008; Dornan, 2009; US 7521541, US 7723485, WO2009/052249). Сконструированные тиольные группы цистеина могут реагировать с описанными в данном документе линкерами или лекарственным средством-линкером, который имеет электрофильные группы, реакционноспособные в отношении тиола, такие как малеимид или альфа-галогенамиды, с образованием конъюгатов с молекулами антител со сконструированными цистеинами и лекарственным средством. Таким образом, можно разработать, контролировать и знать местоположение лекарственного средства. Можно контролировать нагрузку лекарственным средством, так как тиольные группы сконструированного цистеина, как правило, реагируют с реактивами, реакционноспособными в отношении тиола, или реактивами лекарственное средство-линкер с высоким выходом. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты цистеина, посредством замены в одном сайте на тяжелой или легкой цепи обеспечивает получение двух новых цистеинов на симметричном антителе. При необходимости, нагрузка лекарственным средством, близкая к 2, может быть достигнута с почти полной гомогенностью продукта конъюгации.

В некоторых вариантах молекула антитела конъюгата по настоящему изобретению содержит область СН, а лекарственное средство химически конъюгировано с аминокислотой цистеин, вставленной между положениями 239 и 240 области СН, где нумерация константной области соответствует EU-индексу. Следовательно, связь между молекулой антитела и лекарственным средством может осуществляться через данную вставленную аминокислоту цистеин и концевую малеимидную группу на линкере.

Примеры областей СН, которые содержат аминокислоту цистеин, вставленную между положениями 239 и 240 области СН, представлены под SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 45. Примеры тяжелых цепей, содержащих область СН, которая содержит аминокислоту цистеин, вставленную между положениями 239 и 240 области СН, представлены под SEQ ID NO: 50, 53 и 56.

В других вариантах молекула антитела конъюгата не содержит каких-либо аминокислотных остатков, вставленных в область СН. В конкретных вариантах молекула антитела конъюгата не содержит аминокислоты цистеин, вставленной в область СН (например, между положениями 239 и 240, где нумерация константной области соответствует EU-индексу). Как продемонстрировано в примерах (например, в примере 12), при использовании классической конъюгации для конъюгации лекарственного средства-линкера с нативными цистеинами вставленный цистеин не является необходимым.

Примеры областей СН, которые не содержат каких-либо аминокислотных остатков, вставленных в область СН, представлены под SEQ ID NO: 44, 46, 63 и 64. Примеры тяжелых цепей, содержащих область СН, которые не содержат каких-либо аминокислотных остатков, вставленных в область СН, представлены под SEQ ID NO: 51, 54, 57, 59 и 60.

Если более одной нуклеофильной или электрофильной группы молекулы антитела вступает в реакцию с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом с последующей реакцией с реагентом, представляющим собой лекарственное средство, то полученный продукт представляет собой смесь соединений-конъюгатов с распределением лекарственного средства, присоединенного к антителу, например 1, 2, 3 и т. д. Способы жидкостной хроматографии, такие как полимерная обращенно-фазовая хроматография (PLRP) и хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC), позволяют разделить соединения в смеси по величине нагрузки лекарственным средством. Препараты на основе конъюгатов с одним значением (ρ) нагрузки лекарственным средством можно выделять, однако такие конъюгаты с одним значением нагрузки все еще могут представлять собой гетерогенные смеси, поскольку лекарственное средство может быть присоединено посредством линкера к разным сайтам на молекуле антитела.

Таким образом, композиции на основе конъюгатов по настоящему изобретению включают смеси соединений, представляющих собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, где антитело имеет один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственное средство (например, тубулизин или ингибитор топоизомеразы), и где фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены к молекуле антитела по различным аминокислотным остаткам.

В некоторых вариантах среднее количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство тубулизин, на молекулу антитела находится в диапазоне 1-8. В некоторых вариантах диапазон выбран из 1-6, 1-4, 1-3, предпочтительно 1-2, более предпочтительно 1,5-2, даже более предпочтительно 1,8-2, еще более предпочтительно 1,9-2.

Как уже описано выше, в некоторых вариантах молекула антитела из ADC может содержать одну или несколько мутаций в области(-ях) СН тяжелой(-ых) цепи(-ей) для уменьшения или устранения связывания молекулы антитела с одним или несколькими Fc γ -рецепторами. Таким образом, первая и/или вторая тяжелая цепь ADC, описанных в данном документе, могут содержать фенилаланин (F) в положении 234, глутаминовую

кислоту (E) в положении 235 и серин (S) в положении 331, где нумерация соответствует EU-индексу.

Функциональные свойства молекул антител и конъюгатов

Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут быть охарактеризованы со ссылкой на определенные функциональные свойства

Аффинность связывания

Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут характеризоваться антигенсвязывающим доменом, который связывает EGFR с конкретной аффинностью в отношении EGFR, и/или антигенсвязывающим доменом, который связывает c-Met с конкретной аффинностью в отношении c-Met. Аффинность связывания молекулы антитела или конъюгата с когнантным антигеном, таким как EGFR или c-Met человека, мыши или яванского макака, можно определить методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, с помощью Biacore. Аффинность связывания можно определить с использованием молекулы антитела, например, как части молекулы биспецифического антитела, которая содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает c-Met. В качестве альтернативы аффинность связывания можно определить с использованием молекулы антитела, которая является моноспецифической в отношении EGFR или c-Met. В некоторых вариантах аффинность связывания определяют с использованием BIACore, как описано в примере 2.1.

Аффинность связывания, как правило, измеряют с помощью K_d (равновесной константы диссоциации между антигенсвязывающим доменом и его антигеном). Как хорошо известно, чем ниже значение K_d , тем выше аффинность связывания антигенсвязывающего домена. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с мишенью с K_d , составляющей 10 нМ, может считаться связывающим указанную мишень с более высокой аффинностью, чем антигенсвязывающий домен, который связывается с той же мишенью с K_d , составляющей 100 нМ.

Ссылка на EGFR человека может относиться к полипептиду, содержащему внеклеточный домен EGFR, такому как имеющему аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 68. Ссылка на EGFR мыши может относиться к полипептиду, полученному из молекулы, доступной от SinoBiological под каталожным № 51091-M08H. Ссылка на EGFR яванского макака может относиться к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 69. Ссылка на c-Met человека может относиться к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 70. Ссылка на c-Met мыши может относиться к

полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 90, или к полипептиду, полученному из молекулы, доступной от SinoBiological под каталожным № 50622-M08H. Ссылка на с-Met яванского макака может относиться к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 71.

Аффинность к EGFR

Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут содержать антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR с низкой аффинностью. Известно, что EGFR характеризуется низкими уровнями экспрессии в нормальных тканях, например коже, например коже. Ожидается, что молекулы антител и конъюгаты, которые связываются с EGFR с низкой аффинностью, будут преимущественно проявлять сниженную целевую токсичность в нормальных тканях, сохраняя при этом способность нацеливаться на опухоли, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии EGFR, что приводит к улучшению профиля безопасности. Более того, как продемонстрировано в данном, конъюгаты, содержащие данный низкоаффинный EGFR-антигенсвязывающий домен, являются более эффективными при лечении рака по сравнению с конъюгатами, содержащими высокоаффинный EGFR-антигенсвязывающий домен.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с аффинностью, характеризующейся K_d , равной или превышающей 10 нМ, 15 нМ, 20 нМ, 25 нМ, 30 нМ, 35 нМ или 40 нМ. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с K_d , составляющей от 10 до 100 нМ, от 20 до 100 нМ, от 30 до 100 нМ, от 40 до 100 нМ, от 10 до 80 нМ, от 20 до 80 нМ, от 30 до 80 нМ, от 40 до 80 нМ, от 10 до 70 нМ, от 20 до 70 нМ, от 30 до 70 нМ, от 40 до 70 нМ, от 10 до 60 нМ, от 20 до 60 нМ, от 30 до 60 нМ, от 40 до 60 нМ, от 10 до 50 нМ, от 20 до 50 нМ, от 30 до 50 нМ или от 40 до 50 нМ.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с аффинностью, которая ниже аффинности антигенсвязывающего домена, содержащего последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи молекулы антитела QD6, которые представлены под SEQ ID NO: 53 и 55 соответственно.

Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с аффинностью, характеризующейся K_d , которая в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз или 7 раз выше, чем K_d , с которой антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи молекулы антитела QD6, которые представлены под SEQ ID NO: 53 и 55 соответственно, связывает EGFR человека. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR

человека с аффинностью, характеризующейся K_d , которая в 2-10 раз выше, в 3-10 раз выше, в 4-10 раз выше, в 5-10 раз выше, в 6-10 раз выше, в 7-10 раз выше, в 2-9 раз выше, в 3-9 раз выше, в 4-9 раз выше, в 5-9 раз выше, в 6-9 раз выше, в 7-9 раз выше, в 2-8 раз выше, в 3-8 раз выше, в 4-8 раз выше, в 5-8 раз выше, в 6-8 раз выше, в 7-8 раз выше, чем K_d , с которым антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела QD6, которые представлены под SEQ ID NO: 53 и 55 соответственно, связывает EGFR человека.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с аффинностью, которая подобна аффинности антигенсвязывающего домена, содержащего последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи молекулы антитела RAA22, которые представлены под SEQ ID NO: 16 и 20 соответственно. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR человека с аффинностью, характеризующейся K_d , отличающейся в менее чем 5 раз, отличающейся в менее чем 4 раза, отличающейся в менее чем 3 раза, отличающейся в менее чем 2 раза, отличающейся в менее чем 1 раз или отличающейся в менее чем 0,5 раза от аффинности, с которой антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи молекулы антитела RAA22, которые представлены под SEQ ID NO: 16 и 20 соответственно, связывает EGFR человека.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может также связываться с EGFR яванского макака. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR яванского макака с аффинностью, характеризующейся K_d , которая меньше 700 нМ, меньше 600 нМ, меньше 500 нМ, меньше 400 нМ, меньше 300 нМ или меньше 250 нМ. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR яванского макака с аффинностью, характеризующейся K_d , составляющей от 100 до 700 нМ, от 100 до 600 нМ, от 100 до 500 нМ, от 100 до 400 нМ, от 100 до 300 нМ, от 150 до 250 нМ, от 100 до 200 нМ. Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR яванского макака с K_d , которая в менее чем или ровно в 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 раза выше, чем K_d , с которой антигенсвязывающий домен связывается с EGFR человека.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может также связываться с EGFR мыши. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR мыши с аффинностью, характеризующейся K_d , которая меньше 1 мкМ, меньше 900 нМ, меньше 800 нМ, меньше 700 нМ, меньше 600 нМ или

меньше 650 нМ. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, может связываться с EGFR мыши с Kd, составляющей от 100 нМ до 1 мкМ, от 200 до 900 нМ, от 300 до 800 нМ, от 400 до 700 нМ, от 400 до 600 нМ или от 450 до 550 нМ.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, способен связывать EGFR человека и EGFR яванского макака. Данная перекрестная реактивность является преимуществом, поскольку она делает возможным введение доз и тестирование безопасности молекул антител и конъюгатов на яванских макаках во время доклинической разработки. Еще более предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, способен связывать EGFR человека, EGFR яванского макака и EGFR мыши. Например, антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, может быть способен связывать EGFR человека, EGFR яванского макака и EGFR мыши со значениями Kd, представленными выше (например, EGFR человека с Kd, составляющим от 10 до 100 нМ, EGFR яванского макака с Kd, составляющим от 100 до 700 нМ, и EGFR мыши с Kd, составляющим от 100 нМ до 1 мкМ).

Аффинность к с-Met

Антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met человека с аффинностью, характеризующейся Kd ниже 20 нМ, 15 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ или 2,5 нМ. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met человека с аффинностью, характеризующейся Kd, составляющей от 1 до 20 нМ, от 1 до 15 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 9 нМ, от 1 до 8 нМ, от 1 до 7 нМ, от 1 до 6 нМ, от 1 до 5 нМ, от 1 до 4 нМ, от 1 до 3 нМ, от 1 до 2,5 нМ или от 2 до 2,5 нМ.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met яванского макака. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met яванского макака с аффинностью связывания, характеризующейся Kd, которая ниже 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ или 2,5 нМ. В качестве альтернативы антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met яванского макака с аффинностью, характеризующейся Kd, составляющей от 1 до 20 нМ, от 1 до 15 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 9 нМ, от 1 до 8 нМ, от 1 до 7 нМ, от 1 до 6 нМ, от 1 до 5 нМ, от 1 до 4 нМ, от 1 до 3 нМ, от 1 до 2,5 нМ или от 2 до 2,5 нМ. Антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, может связываться с с-Met яванского макака с аффинностью, характеризующейся Kd, которая в менее чем или ровно в 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,

3, 2, 1 раз выше, чем Kd, с которой антигенсвязывающий домен связывается с с-Met человека.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен, который связывается с с-Met, способен связывать с-Met человека и с-Met яванского макака. Данная перекрестная реактивность является преимуществом, поскольку она делает возможным введение доз и тестирование безопасности молекул антител на яванских макаках во время доклинической разработки. Например, антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, может быть способен связывать с-Met человека и с-Met яванского макака с представленными выше значениями Kd (например, с-Met человека с Kd от 1 до 20 нМ и с-Met яванского макака с Kd от 1 до 20 нМ).

Специфическое связывание

Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут содержать антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, который представляет собой антигенсвязывающий домен, который специфически связывает EGFR. Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут содержать антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, который представляет собой антигенсвязывающий домен, который специфически связывает с-Met. Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут содержать первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, который представляет собой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, который представляет собой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает с-Met.

Термин "специфический" может относиться к ситуации, в которой антигенсвязывающий домен не будет проявлять какого-либо значительного связывания с молекулами, отличными от своего специфического партнера(-ов) по связыванию, в данном случае EGFR или с-Met. Такие молекулы называются "отличными от молекул-мишеней". Термин "специфический" также применим, если молекула антитела является специфической в отношении конкретных эпитопов, таких как эпитопы EGFR или с-Met, которые содержатся на множестве антигенов, и в этом случае молекула антитела будет способна связываться с различными антигенами, содержащими эпитоп.

В некоторых вариантах считается, что молекула антитела или конъюгат не демонстрируют какого-либо значительного связывания с молекулой, отличной от молекулы-мишени, если степень связывания с молекулой, отличной от молекулы-мишени, составляет менее приблизительно 10% от связывания антитела с мишенью по результатам измерения, например, с помощью ELISA, SPR, биослойной интерферометрии (BLI),

микромасштабного термофореза (MST) или радиоиммуноанализа (RIA). В качестве альтернативы специфичность связывания может отображаться с точки зрения аффинности связывания, если молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, связываются с EGFR и/или с-Met со аффинностью, которая на по меньшей мере 0,1 порядка величины превышает аффинность в отношении другой молекулы, отличной от молекулы-мишени. В некоторых вариантах молекула антитела или конъюгат по настоящему изобретению связывается с EGFR и/или с-Met с аффинностью, которая на одно значение из по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 или 2,0 порядка превышает аффинность в отношении другой молекулы, отличной от молекулы-мишени.

EGFR является представителем семейства рецепторов ErbB, подсемейства из четырех близкородственных рецепторных тирозинкиназ: EGFR, HER2, HER3 и HER4. Антигенсвязывающий домена RAA22 показывает отсутствие связывания с HER2, HER3 и HER4, что демонстрирует, что данный антигенсвязывающий домен специфически связывает EGFR. Таким образом, в предпочтительном варианте антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, не связывается или не показывает какого-либо значительного связывания с HER2, HER3 или HER4.

с-Met является представителем подсемейства рецепторных тирозинкиназ, которое включает Ron и Sema 4a. Антигенсвязывающий домен B09-GL показывает отсутствие связывания с Ron и Sema 4a, что демонстрирует, что данный антигенсвязывающий домен специфически связывает с-Met. Таким образом, в предпочтительном варианте антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, не связывается или не показывает какого-либо значительного связывания с Ron, Sema 4a.

Одновременное взаимодействие

Молекулы антител и конъюгаты, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, описанные в данном документе, могут характеризоваться способностью обоих антигенсвязывающих доменов одновременно взаимодействовать со своими соответствующими мишенями EGFR и с-Met. Ожидается, что молекулы антител и конъюгаты, способные одновременно взаимодействовать с EGFR и с-Met, будут обладать преимуществом, поскольку известно, что многочисленные опухоли совместно экспрессируют как EGFR, так и с-Met и, следовательно, на них могут нацеливаться молекулы антител по настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах молекула антитела или конъюгат способны одновременно взаимодействовать с EGFR и с-Met.

Одновременное взаимодействие можно определить, например, с помощью анализа цитотоксичности *in vitro* с применением линии клеток, экспрессирующей примерно равные количества EGFR и c-Met, и конъюгата, содержащего молекулы антител с антигенсвязывающими доменами к EGFR и c-Met. Если индивидуальные антигенсвязывающие домены в конъюгате функционируют независимо для доставки лекарственного средства, можно ожидать, что блокирование любой мишени в данной линии клеток лишь незначительно снизит активность конъюгата, сдвигая IC50 в 2 раза или меньше, поскольку мишени присутствуют на одинаковых уровнях. В данном анализе мишени EGFR и c-Met можно блокировать с использованием, например, молекулы моноспецифического антитела, которая связывает ту же область либо на EGFR, либо на c-Met, но не содержит лекарственного средства, которое способно индуцировать цитотоксичность. Например, молекула моноспецифического антитела может содержать тот же антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, или тот же антигенсвязывающий домен, который связывает c-Met, что и конъюгат, подлежащий тестированию. С другой стороны, если конъюгату требуется одновременное взаимодействие для эффективной доставки конъюгата в клетки, блокирование любой мишени, вероятно, будет оказывать большее влияние на активность конъюгата. То есть считается, что молекула антитела способна взаимодействовать с обеими мишенями одновременно, если наблюдается сдвиг IC50 в по меньшей мере 2 раза, предпочтительно в по меньшей мере 5 раз, еще более предпочтительно в по меньшей мере 10 раз после блокирования любой мишени при использовании данного анализа.

Дополнительным способом определения одновременного взаимодействия является сравнение активности биспецифического конъюгата к EGFR-c-Met с одновалентными моноспецифическими контрольными конъюгатами в анализе цитотоксичности *in vitro*. Контрольные конъюгаты содержат один антигенсвязывающий домен либо к EGFR, либо к c-Met и один несвязывающий антигенсвязывающий домен антитела изотипического контроля. Если каждый антигенсвязывающий домен в биспецифическом конъюгате функционирует независимо, ожидаемым результатом было бы то, что каждый моноспецифический контрольный конъюгат был бы лишь незначительно менее эффективным, чем биспецифический конъюгат, и разница была бы аддитивной. В качестве альтернативы, если два антигенсвязывающих домена биспецифического конъюгата функционируют синергически посредством одновременного связывания, можно было бы ожидать больших различий в активности биспецифического конъюгата по сравнению с моноспецифическими контрольными антителами. То есть молекула антитела считается способной одновременно взаимодействовать с обеими мишенями, если

биспецифический конъюгат приводит к сдвигу IC50, превышающему сумму сдвигов IC50, наблюдаемых при использовании моноспецифических контрольных конъюгатов.

Более подробную информацию о данных способах измерения одновременного взаимодействия можно найти в примерах.

Интернализация антител

Молекулы антител и конъюгаты, описанные в данном документе, могут характеризоваться своей способностью опосредовать эффективную интернализацию. Это особенно применимо для конъюгатов, поскольку гарантирует, что конъюгат интернализуется в клетку и доставляется в лизосомы, где молекула антитела впоследствии расщепляется, а лекарственное средство высвобождается в клетку, где оно оказывает свои клеточные эффекты, например цитотоксичность.

Интернализацию молекулы антитела или конъюгата клетками можно проанализировать путем приведения живых клеток в контакт с молекулой антитела и обнаружения молекулы антитела или конъюгата после периода времени, достаточного для интернализации. Интернализацию можно определить путем обнаружения локализации молекулы антитела или конъюгата. Если молекула антитела или конъюгат остаются на поверхности клетки (например, обнаруживаются на поверхности клетки и/или не обнаруживаются внутри клетки), определяют, что молекула антитела или конъюгат не были интернализированы. Если молекула антитела или конъюгат обнаруживаются внутри клетки (например, локализованы в цитоплазме или клеточной органелле), определяют, что молекула антитела или конъюгат были интернализированы.

Иллюстративный способ визуализации того, способны ли молекула антитела или конъюгат опосредовать эффективную интернализацию, включает мечение молекулы антитела с помощью pH-чувствительных красителей, которые проявляют флуоресценцию при кислом pH, и добавление данных меченых молекул антитела или конъюгатов к клеткам. Интернализацию в клетку можно обнаруживать путем отслеживания флуоресценции. Молекулу антитела или конъюгат считают способными опосредовать интернализацию и доставку в лизосомы, если наблюдаемая флуоресценция превышает флуоресценцию меченых несвязывающих контрольных молекулы антитела или конъюгата в течение определенного периода времени, например, 48 часов. Более подробную информацию о данном способе визуализации интернализации антител можно найти в примерах.

Молекулы антител или конъюгаты, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met, могут характеризоваться своей способностью опосредовать более эффективную

интернализацию по сравнению с моноспецифическими контролями к EGFR или c-Met. Ожидается, что молекулы антител и конъюгаты, которые проявляют данные свойства, будут обладать преимуществами, поскольку ожидается, что они будут проявлять большую селективность в отношении опухолевых клеток, совместно экспрессирующих обе мишени, и смогли бы минимизировать влияние молекулы антитела на нормальные ткани, которые не проявляют значительных уровней совместной экспрессии.

Активность in vitro

Молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, могут характеризоваться своей цитотоксической активностью, т. е. своей способностью уничтожать клетки. Цитотоксическую активность можно измерить, например, с помощью анализа жизнеспособности клеток *in vitro*, такого как анализ CellTiter-Glo® (Promega). В некоторых вариантах клетки представляют собой клетки, которые экспрессируют как EGFR, так и c-Met.

Эффективность молекулы антитела можно выразить в виде значения IC50. IC50 представляет собой среднюю подавляющую концентрацию молекулы антитела. В функциональных анализах IC50 представляет собой концентрацию, которая снижает биологический ответ на 50% от его максимума. IC50 можно рассчитать с помощью множества способов, известных из уровня техники.

В некоторых вариантах описанные в данном документе молекулы антител или конъюгаты, обладающие цитотоксической активностью, характеризуются IC50, составляющей менее 4000 пМ, менее 3500 пМ, менее 3000 пМ, менее 2500 пМ, менее 2000 пМ, менее 1500 пМ, менее 1000 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 250 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ или менее 100 пМ при измерении с использованием анализа жизнеспособности клеток *in vitro*. В некоторых вариантах молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, могут характеризоваться IC50, составляющей от 60 до 500 пМ.

В некоторых вариантах молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, способны увеличивать уничтожение клеток, например опухолевых клеток, которые экспрессируют значительные количества как EGFR, так и c-Met, по сравнению с клетками, которые характеризуются низкими уровнями экспрессии одного или другого из EGFR и c-Met. Клетки, экспрессирующие значительные количества как EGFR, так и c-Met, можно определить путем измерения относительной плотности рецепторов на поверхности клетки. Например, клетками, экспрессирующими EGFR и c-Met при относительной плотности рецепторов на поверхности клеток, превышающей 15000, можно считать клетки, которые экспрессируют значительные количества как EGFR, так и

c-Met, а также клетки, которые экспрессируют один из EGFR и c-Met при низкой относительной плотности рецепторов на поверхности клеток, составляющей 15000 или меньше. Относительную плотность EGFR и c-Met можно измерить, например, с использованием набора для количественного анализа методом FACS Quantum MESF, как описано в примерах.

Примеры клеток, которые экспрессируют значительные количества как EGFR, так и c-Met, могут включать линии клеток NCI H596, HCC 827 GR Pool, A549, NCI H1792, NCI H1975, NCI H292 и NCI H358. Примеры клеток, которые экспрессируют один из EGFR и c-Met при низкой относительной плотности рецепторов, могут включать линии клеток A427, H23 NCI и NCI H661 (Ag-отрицательная). Данные линии клеток доступны от ATCC.

В некоторых вариантах молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, способны проявлять цитотоксическую активность в клетках, которые резистентны к клеткам, которые резистентны к ингибиторам тирозинкиназы (TKI). Примеры клеток, резистентных к TKI, могут включать NCI H1975 (мутации EGFR: T790M, L858R) и HCC827 GR Pool (делеция Δ 746-750 EGFR + амплификация MET).

Активность in vivo

В некоторых вариантах молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, способны подавлять развитие или прогрессирование рака.

Рак может представлять собой рак, при котором экспрессируются как EGFR, так и c-Met. Раковые клетки могут экспрессировать EGFR и c-Met на поверхности клеток. Рак может представлять собой, например, рак легкого (такой как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рак поджелудочной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, рак головы и шеи, рак яичника или глиобластому.

Способность данной молекулы антитела или конъюгата подавлять развитие или прогрессирование рака можно анализировать, например, с применением модели in vivo. Например, модель in vivo может предусматривать измерение роста опухоли на модели ксенотрансплантата, полученного от пациента (PDX). Дополнительные подробности данного иллюстративного способа описаны в примерах.

О подавлении развития рака можно сделать вывод при наблюдении более медленного роста опухоли или уменьшения размера опухоли после введения молекулы антитела или конъюгата, например, путем измерения подавления роста опухоли (%TGI). %TGI можно измерить путем сравнения размера опухоли, измеренного в день 0, с размером опухоли, измеренным в конце времени исследования, у тех субъектов, которым вводили молекулу антитела или конъюгат и сравнения данного результата с ростом опухоли в течение того же периода времени у субъектов, которым вводили контрольную молекулу антитела или

конъюгат. Таким образом, %TGI можно определить как процент роста опухоли в сравнении с днем 0 между группой обработки (ТХ) и контрольной (С) группой по формуле: $\%TGI = (1 - (ТХ_{\text{конец}} - ТХ_{\text{начало}}) / (С_{\text{конец}} - С_{\text{начало}})) \times 100$.

В некоторых вариантах молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, характеризуются %TGI, составляющим по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, 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%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

О подавлении развития рака можно сделать вывод при наблюдении отсроченного или предупрежденного появления и/или сниженной степени тяжести симптомов рака в ответ на лечение молекулой антитела. О подавлении прогрессирования рака можно сделать вывод при наблюдении отсроченных, предупрежденных и/или сниженных инвазии и/или метастазирования в ответ на лечение молекулой антитела.

Описанная в данном документе молекула антитела может быть способна подавлять развитие или прогрессирование рака до менее чем 100%, например, до 99% или меньше, 95% или меньше, 90% или меньше, 85% или меньше, 75% или меньше, 70% или меньше, 65% или меньше, 60% или меньше, 55% или меньше, 50% или меньше, 45% или меньше, 40% или меньше, 35% или меньше, 30% или меньше, 25% или меньше, 20% или меньше, 15% или меньше, 10% или меньше, 5% или меньше или 1% или меньше от развития/прогрессирования рака в отсутствие лечения молекулой антитела (или лечения соответствующим контролем). В некоторых вариантах молекула антитела, описанная в данном документе, способна подавлять развитие или прогрессирование рака до менее чем 1-кратного, например, до одного из $\leq 0,99$ -кратного, $\leq 0,95$ -кратного, $\leq 0,9$ -кратного, $\leq 0,85$ -кратного, $\leq 0,8$ -кратного, $\leq 0,85$ -кратного, $\leq 0,75$ -кратного, $\leq 0,7$ -кратного, $\leq 0,65$ -кратного, $\leq 0,6$ -кратного, $\leq 0,55$ -кратного, $\leq 0,5$ -кратного, $\leq 0,45$ -кратного, $\leq 0,4$ -кратного, $\leq 0,35$ -кратного, $\leq 0,3$ -кратного, $\leq 0,25$ -кратного, $\leq 0,2$ -кратного, $\leq 0,15$ -кратного, $\leq 0,1$ -кратного от уровня развития/прогрессирования рака в отсутствие лечения молекулой антитела (или лечения соответствующим контролем).

В некоторых вариантах рак содержит раковые клетки, которые характеризуются высокими уровнями экспрессии EGFR и/или высокими уровнями экспрессии c-Met на поверхности клетки. Способы измерения уровней EGFR и c-Met известны из уровня техники и включают, например, иммуногистохимию.

В некоторых вариантах молекулы антител или конъюгаты, описанные в данном документе, способны увеличивать подавление развития или прогрессирования рака в

клетках, которые демонстрируют высокие уровни как EGFR, так и c-Met, по сравнению с клетками, которые характеризуются низкими уровнями экспрессии одного или другого из EGFR и c-Met.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, экспрессия и очистка

В настоящем изобретении предусмотрены молекула или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулу антитела, описанную в данном документе. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи молекулы антитела, раскрытой в данном документе, полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи молекулы антитела, раскрытой в данном документе, или и то, и другое.

В некоторых вариантах молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты очищают или выделяют, например, из другой нуклеиновой кислоты или природного биологического материала. Специалисту в данной области техники не составит труда получить такие молекулы нуклеиновой кислоты с использованием способов, хорошо известных из уровня техники.

Молекула или молекулы нуклеиновой кислоты могут кодировать домен VH и/или домен VL, предпочтительно домен VH и домен VL из клона RAA22 антитела к EGFR, клона QD6 антитела к EGFR, клона B09-GL антитела к c-Met, предпочтительно клона RAA22 антитела к EGFR или клона B09-GL антитела к c-Met. Последовательности доменов VH и VL таких антител описаны в данном документе. Если нуклеиновая кислота кодирует домен VH и VL или тяжелую и легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению, два домена или две цепи могут кодироваться на двух отдельных молекулах нуклеиновой кислоты.

Например, молекула(-ы) нуклеиновой кислоты может(-гут) содержать:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты домена VH из RAA22, представленную под SEQ ID NO: 17, и/или последовательность нуклеиновой кислоты домена VL из RAA22, представленную под SEQ ID NO: 21;

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты домена VH из QD6, представленную под SEQ ID NO: 19, и/или последовательность нуклеиновой кислоты домена VL из QD6, представленную под SEQ ID NO: 23; или

(iii) последовательность нуклеиновой кислоты домена VH из B09-GL, представленную под SEQ ID NO: 39, и/или последовательность нуклеиновой кислоты домена VL из B09-GL, представленную под SEQ ID NO: 41.

Молекула(-ы) нуклеиновой кислоты может(-гут) кодировать тяжелую цепь и/или легкую цепь, предпочтительно тяжелую цепь и легкую цепь: клон RAA22 антитела к EGFR, клон QD6 антитела к EGFR, клон B09-GL антитела к c-Met, предпочтительно клон RAA22 антитела к EGFR или клон B09-GL антитела к c-Met. Последовательности тяжелой и легкой цепей таких молекул антител описаны в данном документе.

В настоящем изобретении также предусмотрен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу антитела, описанную в данном документе.

Выделенную молекулу нуклеиновой кислоты можно применять для экспрессии молекулы антитела по настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота обычно будет обеспечиваться в форме рекомбинантного вектора для экспрессии. Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную выше. При необходимости можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, в том числе промоторные последовательности, терминаторные фрагменты, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности. Предпочтительно вектор содержит соответствующие регуляторные последовательности для управления экспрессией нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. При необходимости векторами могут быть плазмиды, вирусы, например, фаг или фагмида.

Молекула нуклеиновой кислоты или вектор, описанные в данном документе, могут быть введены в клетку-хозяина. Методики введения нуклеиновой кислоты или векторов в клетки-хозяева надежно отработаны в данной области техники, и можно использовать любую подходящую методику. Из уровня техники известен спектр клеток-хозяев, подходящих для продуцирования молекул рекомбинантных антител, и они включают клетки-хозяева, представляющие собой клетки бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. Предпочтительной клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, такая как клетка CHO, NS0 или НЕК, например, клетка НЕК293.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения молекулы антитела по настоящему изобретению, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела, в клетке-хозяине и необязательно выделение и/или очистку полученной таким образом молекулы антитела. Способы культивирования клеток-хозяев хорошо известны из уровня техники. Способ может дополнительно включать выделение и/или очистку молекулы антитела. Методики очистки молекул рекомбинантных антител хорошо известны из уровня техники и включают, например, HPLC, FPLC или аффинную хроматографию, например, с использованием белка А или

белка L. В некоторых вариантах очистку можно проводить с использованием аффинной метки на молекуле антитела. Способ может также включать составление молекулы антитела в фармацевтическую композицию, необязательно с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или другим веществом, описанным ниже.

Лечение

Как объяснялось выше, совместная экспрессия EGFR и c-Met ассоциирована со многими типами рака, и молекулы антител, которые нацелены на обе молекулы, и особенно конъюгаты, содержащие такие молекулы антител, открывают возможность для широкой клинической пользы при различных показаниях.

Таким образом, молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, могут быть применимы для терапевтических целей, в частности, при лечении рака.

Молекулу антитела, конъюгат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, можно применять в способе лечения организма человека или животного. В родственных аспектах настоящего изобретения предусмотрены:

(i) молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата,

(ii) молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, для применения в способе лечения заболевания или нарушения,

(iii) молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для применения при лечении заболевания или нарушения; и

(iv) способ лечения заболевания или нарушения у индивидуума, где способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества молекулы антитела или конъюгата, которые описаны в данном документе.

Индивидуум может быть пациентом, предпочтительно пациентом-человеком.

Лечение может представлять собой любое лечение или терапию, при которых достигается некоторый требуемый терапевтический эффект, например подавление или задержка прогрессирования состояния, и он включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, уменьшение интенсивности состояния, излечение или ремиссию (будь то частичная или полная) состояния, предупреждение, уменьшение интенсивности, задержку, ослабление или купирование одного или нескольких симптомов и/или признаков состояния или продление срока жизни человека или пациента сверх ожидаемого в отсутствие лечения.

Описанный способ лечения может включать введение индивидууму по меньшей мере одного дополнительного лечения в дополнение к молекуле антитела или конъюгату.

Таким образом, молекулу антитела или конъюгат, описанные в данном документе, можно вводить индивидууму отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими средствами лечения. При введении индивидууму молекулы антитела или конъюгата в комбинации с другим средством лечения дополнительное лечение можно вводить индивидууму одновременно, последовательно или отдельно от введения молекулы антитела или конъюгата. При введении дополнительного средства лечения одновременно с молекулой антитела или конъюгатом молекулу антитела и дополнительное средство лечения можно вводить индивидууму в виде комбинированного препарата. Например, дополнительная терапия может представлять собой известную терапию или терапевтическое средство для заболевания, подлежащего лечению.

Хотя молекулу антитела можно вводить отдельно, молекулы антител или конъюгаты обычно будут вводить в форме фармацевтической композиции, которая может содержать по меньшей мере один компонент в дополнение к молекуле антитела или конъюгату. Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая молекулу антитела или конъюгат, описанные в данном документе. Также предусмотрен способ, включающий составление молекулы антитела или конъюгата в фармацевтическую композицию.

Фармацевтические композиции могут содержать, помимо молекулы антитела или конъюгата, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Термин "фармацевтически приемлемый", используемый в данном документе, относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, по результатам тщательной медицинской оценки, подходят для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или другого осложнения, которые соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, вспомогательное вещество и т. п. также должны быть "приемлемыми" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может представлять собой инфузию, инъекцию или любой другой подходящий путь, как обсуждается ниже.

Введение может быть в "терапевтически эффективном количестве", что является достаточным, чтобы продемонстрировать пользу для индивидуума. Фактическое вводимое количество, а также частота и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести того, что подвергается лечению, конкретного индивидуума, подвергаемого лечению, клинического состояния индивидуума, причины нарушения, местоположения

доставки композиции, типа молекулы антитела, способа введения, графика введения и других факторов, известных практикующим врачам. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и т. д., находится в пределах компетенции врачей общей практики и прочих медицинских специалистов и может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования заболевания, подвергаемого лечению. Соответствующие дозы молекул антител хорошо известны из уровня техники (Ledermann, 1991; и Bagshawe, 1991). Можно применять конкретные дозировки, указанные в данном документе или в Physician's Desk Reference (2003), которые подходят для вводимой молекулы антитела. Терапевтически эффективное количество или подходящую дозу молекулы антитела можно определить путем сравнения активности *in vitro* и активности *in vivo* на животной модели. Известны способы экстраполяции эффективных дозировок у мышей и других подопытных животных на людей. Точная доза будет зависеть от ряда факторов, в том числе от размера и местоположения подлежащей обработке области, а также от точной природы молекулы антитела.

В предпочтительном варианте молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, могут быть предназначены для применения в способе лечения рака.

Рак может характеризоваться патологической пролиферацией злокачественных раковых клеток. При ссылке на конкретный тип рака, такой как рак молочной железы, речь идет о патологической пролиферации злокачественных клеток соответствующей ткани, такой как ткань молочной железы. Вторичный рак, который локализуется в молочной железе, но является результатом патологической пролиферации злокачественных клеток другой ткани, такой как ткань яичника, не является раком молочной железы, на который ссылаются в данном документе, а раком яичника.

Рак может представлять собой первичный или вторичный рак. Таким образом, молекула антитела или конъюгат, описанные в данном документе, могут быть предназначены для применения в способе лечения рака у индивидуума, где рак представляет собой первичную опухоль и/или метастазы опухоли.

Раковая опухоль, подлежащая лечению с применением молекулы антитела или конъюгата, описанных в данном документе, может совместно экспрессировать EGFR и с-Met. В одном варианте опухоль могла быть определена по совместной экспрессии EGFR и с-Met. Способы определения экспрессии мишени известны из уровня техники и включают, например, иммуногистохимию.

Например, рак, подлежащий лечению с применением молекулы антитела или конъюгата, описанных в данном документе, может быть выбран из группы, состоящей из рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рака поджелудочной

железы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака желудка, рака головы и шеи, рака яичника или глиобластомы.

В предпочтительном варианте рак, подлежащий лечению с применением молекулы антитела или конъюгата, описанных в данном документе, выбран из группы, состоящей из рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN или SQHN). В одном варианте подлежащий лечению рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В одном варианте рак представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).

В контексте рака лечение может включать подавление роста рака, в том числе полную ремиссию рака, и/или подавление метастазирования рака, а также подавление рецидива рака. Рост рака обычно относится к любому из ряда показателей, которые указывают на изменение рака в более развитую форму. Таким образом, показатели для измерения подавления роста рака включают снижение выживаемости раковых клеток, уменьшение объема или морфологии опухоли (например, по результатам определения с использованием компьютерной томографии (СТ), сонографии или другого способа визуализации), задержку роста опухоли, разрушение сосудистой сети опухоли, улучшение результатов кожных тестов на гиперчувствительность замедленного типа, увеличение активности противораковых иммунных клеток или других противораковых иммунных ответов, а также снижение уровней опухолеспецифических антигенов. Активация или усиление иммунных ответов на раковые опухоли у индивидуума может улучшить способность индивидуума противостоять росту рака, в частности росту рака, уже присутствующего у субъекта, и/или снизить склонность к росту рака у индивидуума.

Признаки, раскрытые в предшествующем описании, или в последующей формуле изобретения, или в сопутствующих графических материалах, выраженные в их конкретных формах или в контексте средства для выполнения раскрытой функции, или способа или процесса для получения раскрытых результатов, в зависимости от обстоятельств, можно отдельно или в любой комбинации таких признаков использовать для реализации настоящего изобретения в различных его формах.

Хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с иллюстративными вариантами, описанными выше, при ознакомлении с настоящим изобретением специалистам в данной области техники будут очевидны многие эквивалентные модификации и вариации. Соответственно, изложенные в качестве примера варианты настоящего изобретения, представленные выше, считаются иллюстративными, а не

ограничивающими. В описанных варианты можно осуществлять различные изменения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

Во избежание каких-либо сомнений, любые теоретические пояснения, представленные в данном документе, представлены с целью улучшения понимания у читателя. Авторы настоящего изобретения не желают быть связанными какими-либо из таких теоретических пояснений.

Любые заголовки разделов, используемые в данном документе, служат только в организационных целях и не должны пониматься как ограничивающие описываемый объект изобретения.

На протяжении всего данного описания, включая последующую формулу изобретения, если контекст не требует иного, слова "содержать" и "включать", а также такие варианты, как "содержит", "содержащий" и "включающий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа либо стадии или группы целых чисел либо стадий, но не исключение любого другого целого числа либо стадии или группы целых чисел либо стадий.

Следует отметить, что употребляемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если контекста явно не предписывает иное. В данном документе диапазоны могут быть выражены как от "приблизительно" одного конкретного значения и/или до "приблизительно" другого конкретного значения. При изображении такого диапазона другой вариант включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогично, если значения выражены в виде приближений с использованием предшествующего слова "приблизительно", будет понятно, что конкретное значение образует другой вариант. Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению является необязательным и означает, например, +/-10%.

Примеры

ПРИМЕР 1. Разработка и конструирование DuetMab RAA22/B09

В данных примерах описано создание молекул биспецифических антител, которые способны связывать как EGFR, так и c-Met.

1.1. Выделение и идентификация антитела 0021U3-B09 к cMET

cMET-специфические scFv-антитела выделяли из большой библиотеки фагового дисплея наивных scFv человека в серии повторных циклов отбора методом пэннинга на рекомбинантном биотинилированном мономерном cMET человека, экспрессируемом в клетках млекопитающих (MedImmune), фактически так, как описано (Vaughan, 1996). ScFv из раунда 2 результатов отбора экспрессировали в бактериальной периплазме и

подвергали скринингу в отношении их способности ингибировать связывание рецептора cMET человека с лигандом HGF в анализе ингибирования связывания лиганда с рецептором HGF:cMET HTRF® (гомогенная флуоресценция с временным разрешением). Отбирали лучшие хиты, проявляющие сильный ингибирующий эффект, и подвергали их секвенированию ДНК. Затем уникальные гены преобразовывали в антитела на основе иммуноглобулина G2 человека (IgG2) и продуцировали в клетках млекопитающих фактически так, как описано (Persic; 1997). Затем очищенные антитела ранжировали на основании их ингибирующего эффекта в анализе связывания HGF:cMET HTRF®. Для дальнейшего определения характеристик выбрали наиболее эффективное антитело 0021U3-B09.

1.2. Оптимизация антитела 0021U3-B09 к cMET

Для сведения к минимуму потенциальной иммуногенности специфически нацеливались на отличные от верньерных остатки каркасных областей (Foote and Winter 1992) в каркасных областях переменных доменов антитела 0021U3-B09 и их изменяли, чтобы они совпадали с ближайшей последовательностью зародышевой линии человека. В области VH подвергали мутации семь аминокислотных остатков, чтобы они совпадали с эталонной последовательностью IGHV1-8*01 зародышевой линии человека. В области VL подвергали мутации семь аминокислотных остатков, чтобы они совпадали с эталонной последовательностью IGKV1-5*03 зародышевой линии человека. Все остатки в областях VH и VL успешно заменили на остатки зародышевой линии без потери активности. 0021U3-B09 подвергали оптимизации аффинности с использованием способа гибридизационного мутагенеза фактически так, как описано (Kunkel 1985). Крупную библиотеку scFv, полученную из последовательности 0021U3-B09, создавали с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза определяющих комплементарность областей 3 (CDR3) VH с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Библиотеку подвергали отборам на основе аффинности в фазе раствора для отбора вариантов с более высокой аффинностью к антигенам cMET человека и яванского макака. Неочищенные scFv-содержащие экстракты периплазмы, полученные как продукты отбора, нацеленного на CDR, подвергали скринингу в отношении улучшенной ингибирующей активностью в анализе связывания HGF:cMET HTRF®. Варианты, проявляющие значительно улучшенный ингибирующий эффект по сравнению с исходным 0021U3-B09, подвергали секвенированию ДНК, и уникальные гены преобразовывали в IgG2 человека. Очищенные антитела затем ранжировали на основании их ингибирующего эффекта. Для дальнейшего определения характеристик выбрали наиболее эффективное антитело B09-57.

1.3. Выделение и идентификация антитела Tdev-0004 к EGFR

EGFR-специфические scFv-антитела выделяли из большой библиотеки фагового дисплея наивной scFv человека в серии повторных циклов отбора методом пэннинга на рекомбинантном биотинилированном мономерном EGFR человека, экспрессируемом в млекопитающих (MedImmune), фактически так, как описано (Vaughan, 1996). Фаг, на котором представлены ScFv, из раунда 3 результатов отбора подвергали скринингу в отношении их связывания с EGFR человека и яванского макака в ELISA. Отбирали лучшие хиты, показывающие перекрестную реактивность, и их подвергали секвенированию ДНК. Затем уникальные гены преобразовывали в антитела на основе иммуноглобулина G1 человека (IgG1) и продуцировали в клетках млекопитающих фактически так, как описано (Persic, 1997). Затем очищенные антитела ранжировали на основании их связывания с EGFR-экспрессирующей линией клеток A431 методом проточной цитометрии. Для дальнейшего определения характеристик выбрали антитело Tdev-0004, проявляющее специфическое связывание с клетками.

1.4. Оптимизация антитела Tdev-0004 к EGFR

Варианты RAA22 и QD6 получали путем оптимизации mAb Tdev-0004 к EGFR. Каркасные области VL из Tdev-0004 на 100% совпадали с эталонной последовательностью IGLV2-11*01/IGLJ2 зародышевой линии человека (см. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGLV2-11*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p), однако каркасные области VH характеризовались 79% гомологией с ближайшей последовательностью IGHV1-69*01/JH4 зародышевой линией человека (см. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGHV1-69*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p). Для сведения к минимуму потенциальной иммуногенности область VH изначально приводили к полностью зародышевой линии путем осуществления мутации всех 13 остатков каркасной области, отличных от остатков зародышевой линии. После приведения к зародышевой линии связывание полностью приведенного к зародышевой линии варианта с EGFR яванского макака значительно ухудшалось. Для восстановления связывания с EGFR яванского макака четыре остатка, отличных от остатков зародышевой линии, т. е. K68, I73, R76 и T78, подвергали селективной обратной мутации. Аминокислотные остатки пронумерованы по системе нумерации Kabat (Kabat and Wu 1991). Полученный частично приведенный к зародышевой линии вариант под названием H4 применяли в качестве последовательности-шаблона для оптимизации аффинности. Вариант H4 подвергали оптимизации аффинности путем экономного мутагенеза всех шести CDR с применением

набора для сайт-направленного мутагенеза нескольких сайтов QuikChange Lightning (Agilent) в соответствии с инструкциями производителя. Подвергнутые мутагенезу по одной аминокислоте библиотеки VH и VL экспрессировали в бактериях в виде Fab-фрагментов и подвергали скринингу в отношении улучшенного связывания с EGFR человека и яванского макака в ELISA. Варианты, проявляющие улучшенное связывание по сравнению с исходным H4, подвергали секвенированию ДНК, и уникальные гены преобразовывали в IgG1 человека. Идентифицировали вариант RAA22 с единственной мутацией в CDRH3. Для дальнейшего улучшения аффинности отдельные положительные мутации комбинировали с созданием комбинаторной библиотеки, которую подвергали скринингу в отношении вариантов с улучшенным связыванием с EGFR человека и яванского макака. Идентифицировали вариант QD6 с четырьмя комбинированными мутациями в CDRL2, CDRL3 и CDRH3.

1.5. Получение одновалентных биспецифических антител DuetMab к EGFR/cMET

Вариабельные домены mAb B09-57 к cMET и mAb RAA22 и QD6 к EGFR использовали для конструирования одновалентных биспецифических антител к EGFR/cMET на основе платформы DuetMab (Mazor, 2015). В частности, ген VH антитела B09-57 к cMET вставляли в ген константной области тяжелой цепи гамма-1 человека, несущей мутацию по типу “выступ” (T366W) и альтернативные межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V). Ген VL B09-57 вставляли в рамку считывания гена константного домена каппа-цепи человека, несущего соответствующие альтернативные межцепочечные цистеиновые мутации (S121C и C214V), предназначенные для образования пары с тяжелой цепью с “выступом”. Аналогичным образом, гены VH антитела RAA22 к EGFR и антитела QD6 с оптимизированной аффинностью вставляли в ген константной области тяжелой цепи гамма-1 человека, несущей мутации “впадина” (T366S, L368A и Y407V), тогда как гены VL RAA22 и B09-57 вставляли в рамку считывания гена константного домена лямбда-цепи человека, предназначенного для образования пары с тяжелой цепью с “впадиной”. Кроме того, два остатка в доменах СН3 тяжелых цепей с “выступом” и “впадиной” подвергали мутации в цистеин (S354C в цепи с “выступом” и Y349C в цепи с “впадиной”) с получением стабилизирующего дисульфидного мостика. Домен Fc подвергали дополнительному конструированию, чтобы он нес вставку цистеина после серина 239 (C239i/“Maia”), предназначенную для обеспечения сайт-специфической конъюгации цитотоксических лекарственных средств, несущих малеимид (Dimasi, 2017). Аминокислотные остатки пронумерованы по системе нумерации Kabat (Kabat and Wu 1991). Собранные одновалентные биспецифические антитела DuetMab к EGFR/cMET

были обозначены как RAA22/B09-57 и QD6/B09-57 (фиг. 1). Антитела DuetMab продуцировали в клетках млекопитающих, как описано ранее (Mazor, 2017).

Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей DuetMab, полученных в соответствии с данным примером, представлены в следующей таблице:

	RAA22/B09-57	QD6/B09-57
Тяжелая цепь к EGFR	56	53
Тяжелая цепь к с-Met	50	50
Легкая цепь к EGFR	58	55
Легкая цепь к с-Met	52	52

ПРИМЕР 2. Биохимические и биофизические свойства

В данном примере тестируются различные биохимические и биофизические свойства моноклональных антител RAA22, QD6 и B09-57 и молекул биспецифических антител RAA22/B09-57 и QD6/B09-57, в том числе их аффинность связывания с EGFR и с-Met соответственно и их способность одновременно связывать оба антигена.

2.1. Аффинность связывания DuetMab и исходных mAb с EGFR и cMET

Кинетические константы скоростей (k_{on} и k_{off}) и константы равновесной диссоциации (K_D) DuetMab к EGFR-cMET в отношении рекомбинантных антигенов EGFR и cMET человека, яванского макака и мыши определяли при 25°C методом SPR с использованием анализа захвата антител на приборе BIAcore T200 (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Мышиное антитело к IgG человека иммобилизовали на сенсорном чипе CM4 при конечной поверхностной плотности, составляющей ~2000 резонансных единиц (RU). На данном сенсорном чипе также подготавливали поверхность контрольной проточной ячейки с использованием идентичного протокола иммобилизации. Антитела тестируемого и контрольного образца готовили в концентрации 5-20 нМ в буфере для прибора (буфер HBS-EP; 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA и 0,005% P-20) вместе с 3-кратными серийными разведениями очищенных белков EGFR (0,27-200 нМ для белка человека, 0,4-900 нМ для белка яванского макака и 4-1000 нМ для белка мыши) или cMET (0,27-66 нМ для белка человека и 0,27-22 нМ для белка яванского макака) в буфере для прибора. Для кинетических измерений использовали последовательный подход. Сначала антитела вводили над поверхностью захвата со скоростью потока, составляющей 10 мкл/мин. После стабилизации связывания захваченного антитела вводили одну

концентрацию аналита как над поверхностью захвата, так и над контрольной поверхностью при скорости потока, составляющей 75 мкл/мин. Полученные кривые ответа связывания давали данные по фазе ассоциации. Затем, после введения аналита, поток переключали обратно на буфер для прибора на 15 минут, чтобы сделать возможным сбор данных по фазе диссоциации, с последующей 1-минутной подачей 10 мМ глицина, рН 1,5, для регенерации поверхности с захваченным антителом на чипе. Ответы связывания в отношении антител тестируемого и контрольного образца регистрировали при повторных введениях каждой концентрации аналита. Кроме того, на протяжении всей серии введений вперемежку производили несколько введений буфера. Избранные введения буфера использовали вместе с ответами контрольной ячейки для корректировки наборов необработанных данных в отношении артефактов введений и/или взаимодействий, вызванных неспецифическим связыванием, которые обычно обозначаются как “двойной контроль”. Скорректированные данные по связыванию в целом согласовывались с моделью связывания 1:1 (программное обеспечение для расчетов Biacore T200 версии 2.0, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Расчетные кинетические параметры (k_{on} и k_{off}) и K_D , которая определена как k_{off}/k_{on} , представлены в таблице 1.

Таблица 1. Кинетические параметры DuetMab и исходных IgG при связывании антигенов EGFR и cMET

Антитело	Антиген	K_{on} ($M^{-1} c^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
IgG RAA22	EGFR человека	$4,41 \times 10^4$	$2,06 \times 10^{-3}$	46,6
	EGFR яванского макака	$3,54 \times 10^4$	$6,01 \times 10^{-3}$	169,8
	EGFR мыши	$4,03 \times 10^4$	$1,90 \times 10^{-2}$	488,0
	cMET человека	Отсутствие связывания, обнаруживаемого на уровне 200 нМ		
	cMET яванского макака			
	cMET мыши			
IgG QD6	EGFR человека	$1,48 \times 10^5$	$2,92 \times 10^{-4}$	2,0
	EGFR яванского макака	$1,14 \times 10^5$	$2,88 \times 10^{-4}$	2,5
	EGFR мыши	$1,67 \times 10^5$	$7,35 \times 10^{-4}$	4,4
	cMET человека	ND		
	cMET яванского макака			
	cMET мыши			
IgG B09-57	EGFR человека	Отсутствие связывания, обнаруживаемого на уровне 200 нМ		
	EGFR яванского макака			

EGFR мыши				
	сMET человека	$5,63 \times 10^5$	$8,82 \times 10^{-4}$	1,6
	сMET яванского макака	$1,04 \times 10^6$	$1,94 \times 10^{-3}$	1,9
	сMET мыши	Отсутствие связывания, обнаруживаемого на уровне 200 нМ		
DuetMab				
	EGFR человека	$4,47 \times 10^4$	$2,01 \times 10^{-3}$	45,0
RAA22/B09-57	EGFR яванского макака	$2,78 \times 10^4$	$5,48 \times 10^{-3}$	197,0
	EGFR мыши	$3,54 \times 10^4$	$2,06 \times 10^{-2}$	575,4
	сMET человека	$4,43 \times 10^5$	$9,86 \times 10^{-4}$	2,2
	сMET яванского макака	$9,74 \times 10^5$	$2,12 \times 10^{-3}$	2,2
	сMET мыши	ND		
DuetMab				
	EGFR человека	$6,35 \times 10^4$	$3,74 \times 10^{-4}$	5,9
QD6/B09-57	EGFR яванского макака	$2,10 \times 10^5$	$5,85 \times 10^{-4}$	2,8
	EGFR мыши	$1,26 \times 10^5$	$7,80 \times 10^{-4}$	6,2
	сMET человека	$4,25 \times 10^5$	$6,96 \times 10^{-4}$	1,6
	сMET яванского макака	$9,58 \times 10^5$	$2,06 \times 10^{-3}$	2,2
	сMET мыши	ND		

^aND: не определено. Кинетические измерения с растворимыми мономерными формами EGFR и сMET проводили с помощью прибора BIAcore. K_D рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} по результатам нелинейной подгонки данных.

Как можно увидеть из приведенных выше данных, молекула биспецифического антитела QD6/B09-57 связывает с-Met человека с высокой аффинностью ($k_D \sim 2$ нМ) и EGFR человека с высокой аффинностью ($k_D \sim 6$ нМ), тогда как молекула биспецифического антитела RAA22/B09-57 связывает с-Met человека с аналогичной высокой аффинностью ($k_D \sim 2$ нМ), но связывает EGFR человека со сниженной аффинностью ($k_D \sim 45$ нМ) при сравнении с QD6/B09-57.

2.2. Одновременное связывание DuetMab с EGFR и сMET

Исследования одновременного связывания с рекомбинантными белками EGFR и сMET человека проводили путем измерения методом биослойной интерферометрии на приборе Octet384 фактически так, как описано (Mazor, 2015). Вкратце, сначала на биосенсорах NI-NTA захватывали His-меченный антиген сMET в концентрации 5 мкг/мл в буфере для анализа [PBS, pH 7,2, 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,05% (об./об.) Tween 20]. После стадии промывки для удаления любого несвязавшегося белка соответствующие загруженные биосенсоры подвергали последовательным

взаимодействиям ассоциации и диссоциации сначала с 66 нМ антител, а затем с антигеном EGFR при 500 нМ. Кривые ассоциации и диссоциации рассчитывали на основе нелинейной подгонки данных с использованием программного обеспечения Octet384 v.9.0. Как показано на **фиг. 2**, DuetMab демонстрировали одновременное связывание с обоими антигенами, в то время как исходный IgG к cMET проявлял специфическое связывание только с cMET, а два IgG к EGFR не проявляли связывания с сенсорами, загруженными cMET.

2.3. Специфичность в отношении EGFR и c-Met

Специфичность в отношении видовых паралога EGFR и cMET и близкородственных представителей семейства определяли с помощью ELISA. Вкратце, растворы антигена готовили в PBS при концентрации 1 мкг/мл и 50 микролитров наносили на планшеты для анализа методом ELISA с половинным объемом лунок. Планшеты промывали и блокировали с помощью 1% BSA в PBS, содержащем 0,005% Tween-20 (PBS-T), в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали 4 раза посредством PBS-T. Как показано на **фиг. 3**, используемыми первичными антителами были: R374 (несвязывающее антитело изотипического контроля IgG1), B09 (антитело к cMET), QD6 (антитело к EGFR), RAA22 (антитело к EGFR), QD6/B09 (биспецифическое антитело DuetMab к EGFR/c-MET), RAA22/B09 (биспецифическое DuetMab к EGFR/c-MET), Panix (антитело к EGFR), MetMab (антитело к cMET) и Mab11311 (антитело к HER4). Лунки инкубировали с 50 микролитрами указанных первичных антител, разведенных в PBS-T в серии разведений 1:3, начиная с 10 мкг/мл и заканчивая 0,002 мкг/мл, за исключением HER4-связывающего контрольного mAb, MAB1131, для которого серия начиналась при концентрации 1 мкг/мл. Лунки промывали 4 раза в PBS-T, затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл меченого HRP вторичного антитела козы к Fab человека, разведенного 1:5000 в PBS-T, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Во все лунки добавляли по 50 микролитров раствора субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-30 мин до тех пор, пока в лунках положительного контроля не наблюдался интенсивный сигнал. Во все лунки добавляли по 50 микролитров стоп-раствора TMB и считывали поглощение при 450 нм на микропланшет-ридере SpectraMax M5. Данные анализировали в программном обеспечении SoftMax Pro 5 и наносили на график с использованием программного обеспечения для построения графиков GraphPad Prism 7.

Для определения межвидовой перекрестной реактивности проводили анализы методом ELISA, как описано выше. Как показано на **фиг. 3А**, высокоаффинный IgG QD6 к EGFR, а также одновалентное биспецифическое DuetMab QD6/B09 к EGFR/cMET связывались с

EGFR человека, яванского макака и мыши и давали сильные сигналы в анализе методом ELISA. В отличие от этого, IgG RAA22 к EGFR с пониженной аффинностью слабее связывался с EGFR человека, яванского макака и мыши по сравнению с QD6. Связывание с EGFR мыши было слабым, но обнаруживаемым. Соответствующее одновалентное биспецифическое DuetMAb RAA22/B09 к EGFR/cMET показало еще более слабое связывание с EGFR человека и яванского макака относительно двухвалентного исходного IgG RAA22 и номинальное связывание с EGFR мыши. IgG B09 к cMET, а также все биспецифические варианты показали сравнимое связывание с cMET человека и яванского макака. Обнаруживаемого связывания какого-либо из антител с cMET мыши не наблюдали. Данные результаты согласуются с кинетикой связывания, определенной с помощью измерений методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе VIAcore (таблица 1, выше).

Как показано на **фиг. 3В**, ни одно из исходных IgG или производных биспецифических антител не показало заметного связывания с каким-либо из белков семейства HER EGFR, т. е. HER2, HER3 или HER4. Аналогично, ни одно из антител не показало значимого связывания с представителями семейства cMET, Ron (CD136) или семафорином 3а.

Данные результаты демонстрируют, что исходные IgG и полученные биспецифические антитела специфически связываются со своими когнатными мишенями без обнаруживаемого связывания с близкородственными разновидностями из семейства.

ПРИМЕР 3. Отслеживание интернализации антител и их направленного перемещения в подкисленные компартменты с использованием pH-чувствительного красителя

Эффективность конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) отчасти зависит от способности антитела опосредовать эффективную интернализацию и доставку в лизосомы, где антитело впоследствии разлагается. Таким образом, в результате данного разложения в лизосомах цитотоксический поражающий элемент высвобождается, и это позволяет ему оказывать свои клеточные эффекты на опухолевые клетки-мишени. С другой стороны, экспрессия мишени в нормальных, неопухолевых тканях может привести к токсичности, которая уменьшает терапевтический диапазон для ADC. Конструкция биспецифических антител по настоящему изобретению предназначена для сведения к минимуму воздействия ADC на нормальные ткани, которые проявляют небольшую совместную экспрессию мишеней или ее отсутствие, при этом доводя до максимума доставку ADC к опухолевым клеткам, которые совместно экспрессируют две мишени. Чтобы оценить, обеспечивает ли двойное нацеливание с использованием биспецифического антитела RAA22/B09 со сниженной аффинностью к EGFR селективное преимущество по сравнению с взаимодействием с одной мишенью, авторы настоящего

изобретения проводили исследования с использованием меченных рН-чувствительным красителем антител для сравнения эффективности интернализации биспецифического mAb в сравнении с одновалентными исходными антителами, входящими в состав биспецифических.

Визуализацию интернализации и направленного перемещения антител в подкисленные внутриклеточные компартменты, такие как лизосомы и эндосомы, облегчали с использованием антител, меченных рН-чувствительным красителем рHAb (Promega). Данный краситель проявляет очень низкую флуоресценцию при $\text{pH} > 7$, но становится выраженно флуоресцентным при кислом рН, достигая максимума при примерно рН 5. Вкратце, антитела метили с помощью реагирующим с аминок группой красителем рHAb в соответствии с рекомендациями производителя. Метили следующие антитела: IgG1 изотипического контроля R347, одновалентные биспецифические контрольные антитела, такие как антитело RAA22/R347 к EGFR, антитело B09/R347 к cMET, а также одновалентное биспецифическое антитело RAA22/B09 к EGFR/cMET. Клетки рака легкого NCI-H1975, которые совместно экспрессируют на умеренных уровнях EGFR (относительная плотность рецепторов ~ 33000) и cMET (относительная плотность рецепторов ~ 50000), высевали в 96-луночные аналитические планшеты с прозрачным дном и черными стенками в объеме 100 микролитров при плотности 2×10^5 клеток/мл в среде для роста RPMI, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой. Планшеты культивировали в инкубаторе с повышенной влажностью на протяжении ночи при 37°C и 5% CO_2 . Затем планшеты охлаждали на льду в течение 30 мин перед добавлением рHAb-меченных биспецифических и одновалентных контрольных антител при различных концентрациях в предварительно охлажденной среде для роста. Культуры охлаждали на льду в течение дополнительных 30 минут, а затем флуоресценцию считывали на системе визуализации с высоким разрешением Operetta с использованием фильтра Cu_3 и данный начальный результат считывания обозначали как нулевой момент времени. Планшеты перемещали обратно в инкубатор с температурой 37°C и дополнительные показания снимали через 3, 6, 24, 30 и 48 часов.

Репрезентативный эксперимент по интернализации с использованием рHAb-меченных моноклональных антител в концентрации 1,25 мкг/мл для обработки клеток NCI H1975 показан на **фиг. 4**. Несвязывающее антитело IgG1 изотипического контроля R347 не показало обнаруживаемой флуоресценции ни в один из моментов времени. Биспецифическое антитело RAA22/B09 к EGFR/cMET проявляло внутриклеточную флуоресценцию спустя 3 часа, и интенсивность флуоресценции продолжала увеличиваться вплоть до 48 часов после обработки. Одновалентное EGFR-связывающее

контрольное антитело RAA22/R347 показало очень слабую флуоресценцию, начиная с 24 часов, которая резко не возрастала к 48 часам. Одновалентное моноспецифическое сMET-связывающее контрольное антитело B09/R347 показало умеренную флуоресценцию через 24 часа с дополнительным увеличением к 48 часам. Тем не менее, интенсивность флуоресцентного сигнала моноспецифического антитела к сMET была умеренной по сравнению с биспецифическим антителом RAA22/B09, что позволяет предположить, что биспецифическое антитело характеризуется большей эффективностью интернализации, чем моноспецифическое исходное антитело в протестированной в данном опыте линии клеток, экспрессирующей двойную мишень. При обработке клеток рНАb-мечеными моноклональными антителами в концентрации 0,625 мкг/мл разница между биспецифическими антителами и моноспецифическими контролями была еще более выраженной (фиг. 5). Моноспецифические антитела показали очень слабую флуоресценцию даже через 48 часов, тогда как биспецифическое антитело RAA22/B09 снова показало внутриклеточную флуоресценцию спустя 3 часа, и интенсивность флуоресценции продолжала увеличиваться вплоть до 48 часов после обработки. Данные результаты согласуются с гипотезой о том, что биспецифическое антитело с двойным нацеливанием опосредует эффективную интернализацию в клетки, совместно экспрессирующие как EGFR, так и сMET. В то же время моноспецифические исходные антитела показывают пониженное поглощение и пониженную интенсивность флуоресценции по сравнению с биспецифическим антителом. Логическим продолжением этих выводов является предположение о том, что биспецифическое антитело может быть больше похожим на моноспецифические антитела в тканях, которые экспрессируют лишь одну, а не обе мишени, что в целом верно для EGFR и сMET. Особо следует отметить, что рНАb-меченное контрольное mAb RAA22/R347 с пониженной аффинностью к EGFR проявляло незначительное поглощение и незначительную флуоресценцией. Данное сниженное связывание с EGFR могло бы сводить к минимуму влияние ADC в нормальных тканях, таких как кожа, которые экспрессируют значительные уровни EGFR, но экспрессируют сMET на небольшом уровне или вовсе его не экспрессируют.

ПРИМЕР 4. Отслеживание интернализации антител с использованием конфокальной микроскопии

Кинетика интернализации меченых DuetMab: антитела RAA22/B09 и QD6/B09 оценивали *in vitro* с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии живых клеток.

4.1. Материалы и способы

Клетки H1975 и HCC827 предоставлены ATCC. RAA22/B09, QD6/B09 и одноплечевые производные предоставлены компанией MedImmune. QD6/B09 и одноплечевые специфические контроли QD6/IgG и B09/IgG с Fab-плечами IgG получены из неспецифического IgG1 NMGC человека, и они предоставлены компанией MedImmune. RAA22/B09 и одноплечевые специфические контроли RAA22/IgG и B09/IgG получены из неспецифического IgG1 R347 человека, и они предоставлены компанией MedImmune. RPMI (11875–093), HEPES (15630106), пируват натрия (11360070), наборы для мечения моноклональных антител AlexaFluor® 647 (A-20186), центрифужные колонки для обессоливания Zeba™ (87767) и краситель CellTracker™ Blue CMAC (C2110) предоставлены компанией Life Technologies (Карлсбад, Калифорния). Раствор для отделения клеток аккутаза (423201) предоставлен компанией BioLegend (Сан-Диего, Калифорния, США). Термоинактивированная фетальная бычья сыворотка HyClone (SH30071.03HI) предоставлена компанией GE Life Sciences (Мальборо, Массачусетс, США). PBS (21-040) предоставлен компанией Corning Incorporated (Корнинг, Нью-Йорк). Блокирующий FcR реагент (130-059-901) предоставлен компанией MilteNY Biotec Inc. (Оберн, Калифорния). Полипропиленовые круглодонные пробирки (352063) предоставлены компанией BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния). 384-луночные микропланшеты CellCarrier предоставлены компанией PerkinElmer Inc. (каталожный № 6007550, Уолтем, Массачусетс).

Получение конъюгатов с красителем AlexaFluor

Моноклональные антитела конъюгировали с красителями AlexaFluor-647 с использованием наборов для мечения антител в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 50-100 микрограммов антитела в буфере на основе бикарбоната натрия, pH=8,3, инкубировали с реакционноспособными красящими реагентами в условиях слабого перемешивания при комнатной температуре в течение 1 ч. Невключенные красители удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием центрифужных колонок для обессоливания Zeba™ с MWCO 40000, уравновешенных с помощью 1X PBS, в соответствии с инструкциями производителя.

Культивирование и подготовка клеток к окрашиванию

Прикрепленные клетки H1975 или HCC827 культивировали в колбах T-75 в инкубаторах с CO₂ с использованием среды RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), до 80-90% конfluenceности после первоначального посева. В день эксперимента прикрепленные монослои, выращенные в колбах T-75, отделяли в клеточную суспензию с использованием реагента аккутазы. Отделившиеся клетки дважды

промывали с помощью 1x PBS с использованием центрифугирования при 300xg в течение 5 мин. Затем клетки ресуспендировали в RPMI без фенолового красного при концентрации 2×10^6 клеток/мл и использовали для окрашивания.

Окрашивание клеток для визуализации

Суспензию клеток при концентрации 2×10^6 клеток/мл инкубировали в течение 30 мин с 1 мкМ CellTracker™ Blue CMAC, приготовленным в среде RPMI без фенолового красного при 37°C в инкубаторе с CO₂. Невключенный краситель CellTracker™ Blue CMAC удаляли с помощью двух промывок RPMI без фенолового красного с использованием центрифугирования при 300xg в течение 5 мин при 4°C. Затем клетки охлаждали на льду и блокировали с помощью 10 мкл блокирующего FcR реагента на 1×10^6 клеток в течение 15 минут. 2×10^5 клеток разделяли на аликвоты в 5-мл круглодонные пробирки и инкубировали с флуоресцентными антителами при конечной концентрации, составляющей 2,5 мкг/мл. После удаления несвязавшихся флуоресцентных реагентов с помощью центрифугирования при 4°C клетки ресуспендировали в среде RPMI без фенолового красного, содержащей 100 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия и 1% FBS. Клетки переносили в несколько лунок 384-луночного планшета для визуализации при плотности 5000 клеток на лунку и недолго центрифугировали при скорости 2200 об./мин в течение 2 мин при 4°C перед получением изображения.

Получение изображений клеток с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии

Окрашенные клетки в планшетах для визуализации (в 384-луночном формате) либо визуализировали на системе конфокальной флуоресцентной визуализации Opera, как описано ранее (Vainshtein, 2015), либо переносили на инвертированный микроскоп Zeiss Axio Observer.Z1 с объективом 40X/1.2NA LCIPlan Apo (Carl Zeiss Microscopy, Торнвуд, Нью-Йорк). Для экспериментов с применением микроскопа Zeiss среду для визуализации поддерживали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 70% с использованием инкубатора XLmulti S DARK (PeCon GmbH, Эрбах, Германия). Образцы освещали с помощью твердотельных лазеров при длине волны 405, 488, 561 и 63 нм (Carl Zeiss Micrography, Торнвуд, Нью-Йорк). В указанные моменты времени получали серию изображений с использованием блока с вращающимся диском Yokogawa CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Токио, Япония) с EMCCD Evolve 512 (Photometrics, Тусон, Аризона). Перед получением изображения определяли параметры экспозиции, такие как мощность лазера, значения времени экспозиции, кратность увеличения камеры и т. д, с использованием аликвоты окрашенных клеток. Изображения обрабатывали с использованием ZEN 2.3 (Carl Zeiss

Micrography, Торнвуд, Нью-Йорк) и анализировали с использованием программного обеспечения Columbus (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс).

Алгоритм анализа интернализации по изображениям

Алгоритм, используемый для количественной оценки интернализации антител, был описан ранее (Vainsthein, 2015) с последующими обновлениями и модификациями. Эталонный канал, применяемый для итеративной обработки изображений, взят от окрашивания клеток с помощью CellTracker™ Blue CMAC (СТВ). Снимок канала сигнала получен из каналов антитело-AlexaFluor-647 устройств для визуализации. Изображения обрабатывали с помощью алгоритма с применением заданных алгоритмом параметров, которые изначально были установлены как значения по умолчанию, а затем оптимизированы для каждого типа клеток и эксперимента. Окрашивание изображения с помощью СТВ применяли для идентификации клеток с использованием определения пороговой величины для обнаружения области на изображении, характеризующейся более высокой интенсивностью, нежели ее окружение, на основании исключения областей с сигналами интенсивности флуоресценции, которые ниже порогового значения. Остальные идентифицированные клеточные объекты были обозначены как "общая клетка". Клетки дополнительно отбирали с помощью фильтрации по морфологическим свойствам: площади (объекты размером 120-600 мкм²) и округлости (>0,5). Затем в признанных клетках вокруг границ объекта конструировали "мембранную область" и "цитоплазматическую область" с использованием определенных алгоритмом параметров. Интенсивность флуоресценции в каждой области использовали для отслеживания сигналов AlexaFluor-647, ассоциированных с антителами. Интенсивность флуоресценции в каждой области регистрировали как среднее значение суммы всех пикселей в признанных клетках.

Для количественной оценки кинетики интернализации антител использовали накопление ассоциированной с антителами флуоресценции в цитоплазме. Для гарантирования сопоставимости результатов вследствие вариабельности окрашивания клеток и интенсивности флуоресценции цитоплазматические сигналы нормализовали к сигналу "общей клетки" в каждый момент времени и обозначали как интернализированную фракцию с использованием следующего уравнения: Интернализированная фракция = интенсивность (цитоплазма)/(интенсивность (цитоплазма) + интенсивность (мембрана)). Константы скорости интернализации k_{int} рассчитывали по временной динамике интернализации путем подгонки кривой к данным с использованием уравнения: $F_{cyt}(t) = (1 - e^{-k_{int} \cdot t}) \cdot F_{max, cyt}$, где $F_{max, cyt}$ представляет собой максимальное соотношение цитоплазматической интенсивности на клетку к общей

интенсивности на клетку. Подгонку кривой к данным проводили с использованием Graphpad Prism (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния). Полупериод интернализации ($T_{1/2}$) рассчитывали как соотношение $\ln(2)$ и k_{int} .

4.2. Интернализация RAA22/B09 и QD6/B09 *in vitro*

Кинетика интернализации первичных меченных AlexaFluor647 (AF647) DuetMab: антитела RAA22/B09 и QD6/B09 оценивали *in vitro* с использованием линии клеток H1975, экспрессирующих EGFR и с-MET. Каждое антитело предварительно связывалось с клетками, а затем транслокацию антитела с поверхности клетки в цитоплазму отслеживали с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии живых клеток. На **фиг. 6** показано, что оба антитела локализовались преимущественно на поверхности клетки до ($T=0$) того, как подвергались условиям интернализации, и транслоцировались в цитоплазматическую область (синий) через 1 час ($T=1$ ч). Кинетические изображения получали каждые 5 мин на протяжении временной динамики интернализации и обрабатывали с использованием количественного алгоритма (см. выше) для определения кинетических констант и полупериодов интернализации. На **фиг. 6b** показана совершенно сопоставимая кинетика интернализации для QD6/B09 и RAA22/B09 с полупериодами, составляющими $37,5 \pm 10,6$ мин. и $43,2 \pm 15,5$ соответственно.

Для оценки режима интернализации антитела и для исследования вклада каждого плеча в общую интернализацию DuetMab авторы настоящего изобретения оценивали интернализацию молекул одноплечевых специфических контрольных антител QD6/IgG и B09/IgG относительно антитела в форме дуэта QD6/B09, а также RAA22/IgG и B09/IgG относительно антитела в форме дуэта RAA22/B09 в клетках H1975, которые экспрессируют как EGFR, так и с-MET. Поскольку лишь одно плечо является специфическим к рецептору-мишени, контрольное антитело может интернализироваться лишь через один рецептор, что исключает двойное нацеливание на рецепторы и перекрестное сшивание в качестве режима интернализации.

Профили интернализации для QD6/B09 (**фиг. 7A**) и RAA22/B09 (**фиг. 7B**) представляли очень схожие паттерны совпадающего снижения мембранных сигналов mAb-F1647 с соответствующим увеличением сигналов mAb-AF647 в цитоплазме, что является типичным профилем интернализации. Однако, соответствующие одноплечевые конструкции показали очень отличающиеся профили интернализации. Одноплечевое QD6/IgG характеризовалось почти идентичной временной динамикой интернализации, что и DuetMab QD6/B09 (**фиг. 7A**, слева и посередине), что указывает на то, что интернализация антитела в форме дуэта QD6/B09 была в основном обусловлена EGFR-плечом молекулы с минимальным вкладом B09-плеча. Действительно, конструкция

B09/IgG показала очень небольшой уровень интернализации (**фиг. 7В**, справа). Быстрое и значительное снижение мембранного сигнала соответствовало очень умеренному увеличению цитоплазматического сигнала, по-видимому, вследствие значительной диссоциации предварительно связавшегося B09/IgG от рецептора с-MET на поверхности клетки. Диссоциация антитела впоследствии приводила к умеренной интернализации B09/IgG. Эти результаты выявили, что интернализация антитела в форме дуэта QD6/B09 в основном обусловлена EGFR-плечом молекулы с минимальным вкладом B09-плеча.

И напротив, DuetMab RAA22/B09 показало профили интернализации, сильно отличающиеся при сравнении с соответствующими одноплечевыми контрольными антителами. Как видно на **фиг. 7В**, значения цитоплазматической интенсивности были в 10,98 и 4,70 раза выше в случае DuetMab RAA22/B09, чем в случае RAA22-IgG и B09-IgG соответственно. Хотя неэффективная интернализация B09/IgG может быть связана с его выраженной диссоциацией (обсуждается выше), RAA22/IgG действительно подвергалось быстрой интернализации. Однако, вследствие более низкой аффинности EGFR-плеча число молекул RAA22/IgG было в 10,98 раза меньше (на основе интенсивности флуоресценции), чем в случае DuetMab RAA22-B09. Заметно увеличенное количество mAb в форме дуэта RAA22/B09, попадающего в цитоплазму, в отличие от одноплечевых конструкций демонстрировало, что оба плеча антитела должны взаимодействовать с рецепторами-мишенями для обеспечения интернализации. Эти результаты показывают, что DuetMab QD6/B09 и RAA22/B09 характеризуются разными механизмами интернализации, при этом интернализация QD6/B09 в основном обусловлена EGFR-плечом, а для RAA22/B09 требуется взаимодействие обоих EGFR-плеча и с-MET-плеча.

4.3. Интернализация RAA22/B09 в линиях клеток с разными уровнями рецепторов-мишеней

Поскольку связывание как EGFR-плеча, так и с-MET-плеча с рецептором-мишенью содействовало рецепторной интернализации RAA22/B09 в клетках H1975, авторы настоящего изобретения проверили, будет ли увеличенное число рецепторов EGFR и с-MET воздействовать на свойства интернализации. Соответствующие уровни рецепторов, определенные методом вестерн-блоттинга, составляли ~33000 для EGFR и ~50000 для с-MET в клетках H1975 и ~790000 для EGFR и ~523000 для с-MET в клетках HCC827. Профили интернализации RAA22/B09 в клетках H1975 (средний уровень экспрессии рецепторов) и HCC827 (высокий уровень экспрессии рецепторов) показывают заметно повышенную интернализацию в клетках HCC827 (**фиг. 8**).

Как и ожидалось, в соответствии с 23,9-кратным и 10,4-кратным увеличением общих уровней EGFR и с-MET соответственно, связывание RAA22/B09 с клетками HCC827 было

в среднем в 8,9 раза выше, чем с клетками H1975 ($T=0$, $3,1 \times 10^7$ MFI в сравнении с $3,5 \times 10^6$ MFI). Уровни интернализации (судя по пиковой цитоплазматической интенсивности) были в 21,7 раза выше в клетках HCC827, что позволяет предположить, что в цитоплазму клеток, экспрессирующих высокие уровни рецепторов-мишеней, проникают значительно более высокие концентрации антител. Важно отметить, что помимо заметно различающихся значений интенсивности, между клетками HCC827 и H1975 также значимо различались профили интернализации (мембранные и цитоплазматические сигналы с течением времени). В клетках HCC827 с высоким уровнем экспрессии снижение мембранного сигнала RAA22/B09-AF647 соответствовало ответному увеличению цитоплазматического сигнала RAA22-B09, при этом общий сигнал RAA22/B09 сохранялся на протяжении всего времени, что указывает на сильное взаимодействие двухплечевых антител с обоими рецепторами и последующую интернализацию. В клетках H1975 наблюдалось одновременное снижение общей и мембранной интенсивности, что указывает на то, что порции предварительно связавшегося антитела могли диссоциировать от поверхности клетки и не смогли интернализироваться внутрь клетки. Схожие профили, свидетельствующие о диссоциации, наблюдали для интернализации RAA22/IgG и B09/IgG в клетках HCC827, где одноплечевое взаимодействие не приводило к эффективному связыванию и было предрасположено к диссоциации (**фиг. 9А и В**). Эти данные позволяют предположить, что смешанный режим взаимодействия с рецептором (одноплечевое и двухплечевое взаимодействие) присутствует при интернализации RAA22/B09 в клетки H1975. В совокупности эти данные позволяют предположить, что уровни экспрессии рецепторов-мишеней клетки являются важным фактором, определяющим степень и эффективность интернализации RAA22/B09.

ПРИМЕР 5. Конъюгация тубулизина AZ1508

5.1. Сайт-специфическая конъюгация

Конъюгацию лекарственного средства тубулизин с молекулой антитела RAA22/B09 проводили фактически так, как описано ранее в Thompson, 2016 и US20150291657A1.

5.2. Оценка возможности разработки

Возможность разработки оценивали как для неконъюгированного промежуточного продукта DuetMAb (DuetMAb к cMet-EGFR, RAA22-B09), так и для конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), который состоит из DuetMAb, конъюгированного с 2 молекулами тубулизина AZ1508. Оценка возможности разработки для ADC на основе антитела к EGFR-cMET и тубулизина предусматривала оценку факторов неустойчивости

последовательностей, стабильности, биохимических/биофизических свойств и технологичности.

Факторы неустойчивости последовательностей

Аминокислотную последовательность RAA22-B09 оценивали в отношении наличия известных факторов неустойчивости, в том числе сайтов дезамидирования, сайтов окисления и введенных сайтов гликозилирования в области CDR. Анализ не выявил никаких факторов неустойчивости последовательностей, которые считались бы несущими высокий риск.

Стабильность

Исследования стабильности проводили для промежуточного продукта mAb RAA22-B09 при концентрации 50 мг/мл в 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы, pH 6,0, и для конъюгированного ADC при концентрации 5 мг/мл в 20 мМ гистидина, 7% сахарозы, pH 6,0. Материал разливали в бутылки из HDPE.

Материал тестировали после проведения 3-х циклов замораживания-оттаивания (от -80°C до комнатной температуры) и после инкубации при 5°C, 25°C и 40°C.

Образцы анализировали спустя 1 месяц, а в случае материалов, хранившихся при 5°C и при 25°C, также еще и спустя 2 месяца.

Видимые частицы были видны в случае промежуточного продукта mAb. Однако для разработки риск данных частиц был признан низким, и их можно легко удалить фильтрацией перед конъюгацией. ADC оставались практически не содержащими видимых частиц.

В ходе исследований стабильности ADC при 5°C, 25°C и 40°C никаких изменений не наблюдали. Не наблюдали и увеличения содержания свободного лекарственного средства.

Минимальные изменения степени мономерной чистоты наблюдали после хранения при 5°C и при 25°C как для промежуточного продукта mAb, так и для ADC.

ADC сохранял цитотоксическую активность после инкубации при указанных температурах в течение 4 недель. Был сделан вывод, что ADC проявляет хорошую термостабильность.

Биохимические/биофизические свойства

Температуру термического плавления промежуточного продукта mAb и ADC определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Обнаружили, что конъюгация не снижает существенно температуру плавления. После конъюгации наблюдается гомогенная совокупность.

В заключение необходимо отметить, что промежуточный продукт mAb к cMET-EGFR (RAA22-B09-Maia) и соответствующий ADC с полезной нагрузкой AZ1508 были признаны как несущие низкий риск с точки зрения возможности разработки.

5.3. Анализ *ex vivo* стабильности RAA22/B09-AZ1508 в сыворотке крови у крыс, мышей и яванских макаков

RAA22/B09-AZ1508 разводили в 0,2 мкМ отфильтрованной сыворотке крови крыс, мышей и яванских макаков до конечной концентрации 200 мкг/мл и не инкубировали или инкубировали при 37°C в течение одного, трех и семи дней. Активированные посредством NHS сефарозные гранулы (GE Healthcare) трижды промывали с помощью 1X фосфатно-солевого буфера (PBS; pH 7,4) посредством центрифугирования при 1 x 1000 g в течение одной минуты для удаления изопропанолового раствора для хранения. Одну десятую объема бикарбоната натрия (1 M [об./об.]) добавляли к рекомбинантному белку EGFR-ECD (2,12 мг/мл; партия № C20202OCT14C) и 6 мл данной смеси инкубировали с 3 мл промытых активированных посредством NHS сефарозных гранул. Смесь гранул инкубировали на протяжении ночи при комнатной температуре. Гранулы трижды промывали с помощью 1X PBS (pH 7,4) для удаления несвязавшегося EGFR. Эффективность иммобилизации была определена на уровне 93% путем сравнения количества связавшегося EGFR относительно исходного количества с использованием системы для HPLC серии Agilent 1200 и колонки для эксклюзионной хроматографии Tosoh Bioscience TSKgel G3000 в соответствии с рекомендацией производителя. RAA22/B09-AZ1508 выделяли из сыворотки крови путем инкубации 100 мкл инкубированной смеси RAA22/B09-AZ1508-сыворотка крови с 50 мкл гранул EGFR в течение 30 минут при комнатной температуре с последующими тремя последовательными промывками с помощью 1X PBS-буфера и элюированием с помощью 100 мкл буфера для элюирования антител (буфер для элюирования IgG; ThermoScientific). Элюент анализировали с помощью rLCMS для расчета количества оставшегося интактного ADC. С использованием обращенно-фазовой масс-спектрометрии (rLCMS) на системе для HPLC серии Agilent 1290, соединенной с системой Agilent 6520 Accurate-Mass TOF LC/MS с источником ионизации электрораспылением, оставшийся ADC рассчитывали с использованием интенсивности пикового значения, полученной с использованием программного обеспечения для сбора данных и обработки хроматограмм MassHunter от Agilent. Примерно 2 мкг (35 мкл) восстановленного элюента загружали в колонку Poroshell 300SB-C3 (2,1×75 мм, 255 Agilent) и элюировали со скоростью потока 0,4 мл/ми, с использованием ступенчатого градиента 60% В после 6 минут 256 (растворитель А: 0,1% муравьиная кислота в воде; растворитель В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле).

Интенсивность пикового значения интактных конъюгированных и неконъюгированных или модифицированных разновидностей ADC использовали для расчета процента оставшегося ADC путем деления интенсивности пикового значения интактных конъюгированных молекул на общую интенсивность пикового значения разновидностей ADC. Результаты показаны в **таблице 2** ниже.

Таблица 2

% конъюгации после инкубации в сыворотке крови				% деацетилирования после инкубации в сыворотке крови			
RAA2/BO9-Maia-AZ1508	Мышь	Крыса	Яванский макак	RAA2/BO89-Maia-AZ1508	Мышь	Крыса	Яванский макак
Момент времени 0	93%	93%	92%	Момент времени 0	3%	4%	3%
День 1	91%	91%	91%	День 1	7%	12%	8%
День 3	90%	86%	86%	День 3	15%	40%	36%
День 7	84%	83%	84%	День 7	40%	41%	37%

Этих данные показывают скорость деконъюгации всей полезной нагрузки от ADC и метаболизм ADC в результате высвобождения О-ацетильной группы из поражающего элемента тубулизина в сыворотке крови мыши, крысы и яванского макака в условиях *ex vivo*. Результаты демонстрируют, что через одну неделю инкубации с сыворотками крови любого из трех видов при 37°C потеря конъюгированной полезной нагрузки меньше или равна 10%. Начальная скорость де-О-ацетилирования поражающего элемента тубулизина от ADC, по-видимому, немного различается у трех разновидностей, но степень де-О-ацетилирования в день 7 является одинаковой у всех трех разновидностей и составляет около 40%.

ПРИМЕР 6. Цитотоксичность ADC *in vitro*

В данном примере на панели линий раковых клеток измеряли *in vitro* эффективность биспецифических ADC к EGFR/cMET.

6.1. Количественная характеристика панели линий клеток методом FACS

FACS проводили, чтобы количественно оценить относительную плотность EGFR и c-Met в тестируемых линиях клеток.

Мечение антител

Очищенные антитела PanIX, антитело к EGFR-cMet и R347 метили с использованием набора для мечения моноклональных антител Alexa Fluor 647 в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen, каталожный № A20186). Концентрацию антител

и соотношение флуорохрома к белку (F:P) рассчитывали с использованием спектрофотомера NanoDrop ND-1000.

Проточная цитометрия

Клетки собирали и промывали до получения суспензии отдельных клеток. Число и жизнеспособность клеток ($\geq 90\%$) определяли с помощью анализатора Vi-Cell XLR (Beckman Coulter). Концентрацию клеток доводили до 5×10^6 клеток/мл в ледяном буфере для FACS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, 5% FBS, 0,1% азид натрия) и высевали в 96-луночный полистирольный планшет с U-образным дном при плотности 250000 клеток/лунка. Конъюгированные с Alexa 647 антитела серийно разводили в холодном буфере для FACS в различных концентрациях (0,15-40 мкг/мл) в двух повторностях для построения кривой связывания. Клетки и первичные антитела инкубировали на влажном льду в течение 20 минут в темноте. Клетки промывали 2 раза холодным буфером для FACS и фиксировали в 200 мкл ледяного 2% параформальдегида (PFA). Для сбора данных использовали красный лазер с длиной волны 640 нм, поскольку возбуждение и испускание у Alexa 647 составляет 650/668 нм. Для каждого образца с помощью прибора Becton-Dickenson LSR II с программным обеспечением FACSDiva™ регистрировали двадцать тысяч событий. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

Анализ EGFR, EGFR-cMet; MESF (молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома) Quantum

Количество EGFR, EGFR-cMet на клетках оценивали с использованием гранул MESF Quantum с Alexa Fluor 647 (каталожный № 647C, Bangs Laboratories). Для каждого образца регистрировали 10000 событий (LSR II), используя те же настройки проточной цитометрии, что и для перечисленных выше образцов. Для построения стандартной кривой, связывающей значение канала с интенсивностью флуоресценции в единицах MESF, использовали программу QuickCal (www.bangslabs.com). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) прямо пропорциональна количеству присутствующего флуорохрома, что используется для расчета числа молекул на клетку. Показатель MESF, рассчитанный с помощью программы Quickcal, делят на соотношение F:P антител с получением скорректированной ABC (связывающей способности антител).

6.2. Способы определения цитотоксической активности ADC

Цитотоксическую активность ADC тестировали на нескольких линиях клеток следующим образом. Клетки высевали с плотностью 10000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в объеме 100 мкл в рекомендованной для них культуральной среде, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки. 3X концентрацию каждой дозы

подлежащего тестированию антитела готовили путем серийного разведения исходного раствора антитела в культуральной среде. Пятьдесят микролитров каждого тестируемого образца добавляли к клеткам в трех повторностях так, чтобы конечная концентрация антитела находилась в диапазоне от 60 нМ до 0,0009 нМ. Обработанные клетки культивировали в течение 72 часов при 37 градусах С в инкубаторе с повышенной влажностью. Метаболическую активность определяли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo от Promega согласно инструкциям производителя. Данные наносили на график в виде процента метаболической активности относительно контроля без обработки. Значения IC₅₀ определяли с использованием логистического нелинейного регрессионного анализа между максимальной жизнеспособностью (клетки без обработки) и максимальным ответом (пиковое подавление) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

6.3. Результаты – *in vitro* активность ADC в отношении панели линий клеток

In vitro эффективность биспецифического ADC к EGFR/cMET измеряли на панели линий раковых клеток с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo. Как показано в **таблице 3**, как QD6/B09-AZ1508 с более высокой аффинностью, так и RAA22/B09-AZ1508 с пониженной аффинностью проявляли широкую активность в отношении всех линий клеток с различными уровнями экспрессии мишени.

Таблица 3. *In vitro* активность ADC DuetMAb к EGFR-cMET

Линия клеток	Относительная плотность EGFR	Относительная плотность cMET	Высокоаффинный ADC QD6/B09-AZ1508		ADC с пониженной аффинностью к EGFR RAA22/B09-AZ1508	
			IC ₅₀ (пМ)	Макс. % подавления	IC ₅₀ (пМ)	Макс. % подавления
НСС 827, исходные	1, 513, 899	236, 933	96	79%	132	55%
NCI H596	938,023	28,353	274	54%	3,237	67%
НСС 827	760, 040	523, 298	33	66%	168	59%

GR Pool						
A549	88,385	16,483	118	45%	667	36%
NCIH1792	63,820	20,658	81	80%	200	81%
NCIH1975	33,086	50,339	178	65%	255	65%
NCIH292	96,538	16,497	91	79%	271	62%
A427	20,236	9,734	6,959	12%	40,220	58%
NCIH358	15,065	16,429	168	29%	3,017	30%
NCIH23	9,843	21,669	>60,000	~5%	8,096	46%
NCI H661 (Ag-отрицательные)	ND – 9906	ND - 8114	>60,000	0	>66,667	10%

В целом, ADC с пониженной аффинностью к EGFR показали сопоставимую, хотя и несколько сниженную эффективность в отношении широкого спектра линий клеток, которые совместно экспрессируют значительные количества как EGFR, так и cMET. В целом оба ADC показали сниженную эффективность, когда одна или другая мишень характеризовалась низкой относительной плотностью рецепторов на поверхности клетки, составлявшей приблизительно 15000 или меньше. Данный эффект был более выраженным у варианта с пониженной аффинностью, который оказался более чувствительным к более низким уровням cMET.

ПРИМЕР 7. Эксперименты по проверке обоснованности концепции (POC) в отношении цитотоксичности ADC *in vitro*

Для дальнейшего тестирования гипотезы о том, что для оптимальной доставки ADC требуется биспецифическое взаимодействие антитела с пониженной аффинностью к EGFR-cMET, авторы настоящего изобретения провели эксперименты *in vitro* для определения относительного вклада индивидуальных плеч антител в активность биспецифического ADC. В первом эксперименте авторы настоящего изобретения использовали избыток исходных антител без поражающего элемента для блокировки либо EGFR, либо cMET, а затем измеряли активность биспецифического ADC к EGFR-cMET в анализе цитотоксичности *in vitro*. Для данного эксперимента авторы настоящего

изобретения использовали линию клеток, которые экспрессируют EGFR и cMET на умеренных уровнях в примерно равных количествах. Если индивидуальные плечи в биспецифическом ADC функционируют независимо для доставки ADC, можно ожидать, что блокирование любой мишени в данной линии клеток лишь незначительно снизит активность ADC, сдвигая IC₅₀ в два раза или меньше, поскольку мишени присутствуют на одинаковых уровнях. С другой стороны, если ADC требуется двойное взаимодействие с мишенью для эффективной доставки ADC в клетки, блокирование любой мишени, вероятно, будет оказывать большее влияние на активность биспецифического ADC. В связанном эксперименте авторы настоящего изобретения сравнивали активность биспецифического ADC к EGFR-cMET с одновалентными моноспецифическими контрольными антителами, состоящими из одного плеча, связывающегося либо с EGFR, либо с cMET, и одного несвязывающегося плеча антитела изотипического контроля. Аналогично, если каждое плечо функционирует независимо, ожидаемым результатом было бы то, что каждый моноспецифический контрольный ADC был бы лишь незначительно менее эффективным, чем биспецифический ADC, и разница была бы аддитивной. В качестве альтернативы, если два плеча биспецифической молекулы функционируют синергически, можно было бы ожидать больших различий в активности биспецифического ADC по сравнению с моноспецифическими контрольными антителами.

7.1. Способы

Цитотоксическую активность ADC тестировали на линии клеток NCI-H1975 следующим образом. Клетки высевали с плотностью 10000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в объеме 50 мкл для экспериментов по блокированию и 100 мкл для экспериментов с одновалентным ADC в рекомендованной для них культуральной среде, дополненную 10% фетальной бычьей сыворотки. Для экспериментов по блокированию с mAb без поражающего элемента в лунки добавляли 50 мкл раствора либо IgG к EGFR (RAA22), либо IgG к cMET (B09) с концентрацией 300 мкг/мл и предварительно инкубировали в течение одного часа при 37 градусах C в инкубаторе с повышенной влажностью. 3-кратную концентрацию каждой дозы подлежащего тестированию антитела готовили путем серийного 4-кратного разведения исходного раствора антитела в культуральной среде. Пятьдесят микролитров либо только среды, либо ADC с IgG изотипического контроля (R347-AZ1508), либо ADC к EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) добавляли к клеткам в трех повторностях, чтобы конечная концентрация антитела находилась в диапазоне от 67 нМ до 0,0009 нМ. Для эксперимента с одновалентным ADC 50 мкл 3-кратных исходных растворов одного из ADC изотипического контроля (R347-AZ1508), одновалентного ADC к EGFR (RAA22/R347-AZ1508), одновалентного ADC к

cMET (B09/R347-AZ1508), эквимолярных комбинаций одновалентных ADC или ADC к EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) добавляли в трех повторностях в серии 4-кратных разведений, начиная с 60 нМ и заканчивая 0,009 нМ. Обработанные клетки культивировали в течение 72 часов при 37 градусах С в инкубаторе с повышенной влажностью. Метаболическую активность определяли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo от Promega согласно инструкциям производителя. Данные наносили на график в виде процента метаболической активности относительно контроля без обработки. Значения IC₅₀ определяли с использованием логистического нелинейного регрессионного анализа между максимальной жизнеспособностью (клетки без обработки) и максимальным ответом (пиковое подавление) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

7.2. Результаты и выводы – *in vitro* проверка обоснованности концепции двойного нацеливания (эксперимент по блокированию с помощью mAb и действие одновалентных ADC)

Авторы настоящего изобретения провели эксперименты *in vitro* по изучению относительного вклада индивидуальных плеч антител в цитотоксическую активность биспецифического ADC, которые описаны выше. Как показано в репрезентативном эксперименте на **фиг. 10**, предварительная обработка клеток NCI H1975 с помощью IgG RAA22 к cMET приводила к сдвигу IC₅₀ у ADC к EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) от примерно 60 пМ до 3480 пМ, при этом разница была приблизительно 60-кратной. Обработка с помощью IgG B09 к cMET приводила к сдвигу IC₅₀ до 680 пМ, при этом разница была более чем 11-кратной. Аналогично, при обработке клеток NCI H1975 одновалентным моноспецифическим ADC к EGFR (RAA22/R347-AZ1508) IC₅₀ составляла приблизительно 20500 пМ по сравнению с 316 пМ для биспецифического ADC к EGFR-cMET, при этом разница была приблизительно 65-кратной (**фиг. 11**). IC₅₀ одновалентного моноспецифического ADC к cMET (B09/R347-AZ1508) составляла 2772 пМ, при этом разница по сравнению с биспецифическим антителом была приблизительно 13-кратной.

В совокупности эти данные позволяют предположить, что эффективное нацеливание ADC к EGFR-cMET на опухолевые клетки, совместно экспрессирующие обе мишени, в значительной степени обусловлено биспецифическим взаимодействием ADC. Более того, данные результаты показывают, что плеча, связывающего EGFR со сниженной аффинностью, недостаточно для содействия эффективной доставке ADC в отсутствие связывания cMET, что демонстрирует резкое уменьшение эффективности, когда плечо к cMET заблокировано антителом без поражающего элемента, а также слабая цитотоксичность одновалентного контрольного ADC RAA22/R347-AZ1508 к EGFR. В

совокупности эти результаты согласуются с гипотезой о том, что сниженная аффинность EGFR-связывающего плеча биспецифического ADC (RAA22/B09-AZ1508) будет содействовать доставке ADC к опухолям, совместно экспрессирующим EGFR и cMET, одновременно проявляя сниженную цитотоксичность по отношению к клеткам, которые преимущественно экспрессируют только одну из мишеней. Данный эффект наиболее заметен, когда для взаимодействия доступен только EGFR, что имеет значение для уменьшения EGFR-обусловленной токсичности в нормальных органах, таких как кожа, в которой экспрессируются значительные уровни EGFR, но относительно немного cMET.

ПРИМЕР 8. *In vivo* фармакология ADC в моделях на основе полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX)

Модели рака человека на основе полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX) стали хорошо зарекомендовавшей себя альтернативой ксенотрансплантатам опухолей на основе линий опухолевых клеток. Модели на основе PDX создают из первичной опухолевой ткани пациента, имплантированной непосредственно в иммунодефицитных мышей для получения размножающихся *in vivo* опухолей у мыши. Полученные таким образом опухоли впоследствии размножают в дополнительных мышцах без культивирования *in vitro* для создания банка опухолевой ткани на основе PDX с небольшим числом пассажей, который можно использовать для имплантации исследуемым мышам. Одной из ключевых особенностей моделей на основе PDX является то, что они в значительной степени сохраняют гистологическую и геномную гетерогенность и сохраняют профиль генной экспрессии соответствующей исходной опухоли пациента. По сравнению с моделями ксенотрансплантатов на основе линий опухолевых клеток, в которых используются клональные популяции опухолевых клеток, которые были адаптированы к росту *in vitro*, характеристики моделей на основе PDX предназначены для более точного воспроизведения признаков реальных опухолей человека, тем самым улучшая прогностическую ценность доклинических мышинных моделей. Действительно, многочисленные исследования показали, что профили ответа и резистентности моделей на основе PDX к стандартным средствам лечения тесно коррелируют с клиническими данными у субъектов-людей с профилем заданной опухоли.

Несмотря на усовершенствования, которые обеспечивают модели на основе PDX, существуют ограничения для стандартных схем фармакологических исследований *in vivo*, даже если их применяют в отношении моделей на основе PDX. Для каждой модели опухоли в типичном исследовании тестируют обработку лекарственным средством на нескольких уровнях дозы вместе с одним или несколькими соединениями положительного или отрицательного контроля, с количеством мышей на группу

обработки, достаточным для подтверждения статистики в пределах модели. Относительно большое число мышей, используемых для такого дизайна исследования, и более высокая стоимость моделей на основе PDX могут ограничить число моделей опухолей, которые можно практически протестировать для заданного соединения. Альтернативным/дополняющим подходом к традиционному дизайну исследования является испытание на основе мышей с PDX, популяционный подход, разработанный по образцу дизайна клинических испытаний на людях. В данном подходе для каждого соединения, как правило, одну мышшь обрабатывают одним уровнем дозы, установленным на основе предыдущих исследований по определению диапазона доз, с дополнительной контрольной группой обработки для каждой модели. Вследствие небольшого числа мышей, требуемых для каждой модели, можно протестировать множество моделей на основе PDX, каждая из которых представляет уникальную опухоль человека. Вместо того, чтобы опираться на статистику в пределах модели, ответы оценивают по всей популяции протестированных моделей опухолей. Данный подход может обеспечить более точную оценку частоты ответа в широком диапазоне экспрессии мишеней, молекулярных фенотипов, подтипов опухолей или других клинически значимых признаков, представляющих интерес. Более того, большое число уникальных моделей, которые можно тестировать в испытании на основе PDX, может позволить провести более продуктивные исследования геномики, транскриптомики или профилирования экспрессии, чтобы начать ранний поиск корреляций ответа или резистентности. Для описанного в данном документе иллюстративного исследования авторы настоящего изобретения использовали "неограниченный" подход, тестируя все доступные модели NSCLC в START Discovery, независимо от уровня экспрессии мишени или молекулярного фенотипа.

8.1. Способы

Испытания на основе мышей с PDX проводили в South Texas Accelerated Research Therapeutics (START, Сан-Антонио, Техас). START аккредитована AAALAC International (Международная ассоциация по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных) и соответствует международному стандарту по уходу и содержанию животных AstraZeneca. Все модели были разработаны в START. Модели на основе полученных от пациента ксенотрансплантатов (START-PDX) создавали из жизнеспособной опухолевой ткани или биологической жидкости человека и последовательно пассировали на животных ограниченное число раз для поддержания гетерогенности опухоли. Бестимусным "голым" мышам (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu)/CB-17 Scid (CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrI) односторонне имплантировали в бок фрагменты опухоли, собранные

от животных-хозяев, при этом каждый из партии определенного пассажа. Объемы опухоли до исследования регистрировали, начиная приблизительно за неделю до его предполагаемой даты начала. Когда опухоли достигали соответствующего диапазона объема опухоли для начала испытания (TVI) (125-250 мм³) животных рандомизировали в группы обработки и контрольную группу и начинали внутривенное (IV) введение дозы (день 0); при этом за животными наблюдали индивидуально на протяжении всего исследования. Введение начальной дозы начинали в день 0; животным во всех группах вводили I.V. дозу по весу (0,01 мл на грамм; 10 мл/кг). Животным, которых обрабатывали лекарственным средством, вводили дозы каждые 7 дней, в общей сложности 4 дозы. Размеры опухоли измеряли с помощью цифрового штангенциркуля, начиная с дня 0, и оценочные объемы опухоли регистрировали для каждого подвергнутого обработке и контрольного животного; при этом объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: TV= ширина² x длина x 0,52. Наблюдения за ростом опухоли продолжали в течение одной недели после введения последней дозы. Каждое животное умерщвляли по достижении конечной точки объема опухоли (TV) (объем опухоли ≥ 1 см³) или конечной точки времени исследования, составляющей 28 дней, в зависимости от того, что наступало раньше. Период наблюдения продлевали для некоторых моделей на основе PDX с медленно растущими опухолями. Подавление роста опухоли (%TGI) определяли как процент роста опухоли в сравнении с днем 0 между группой обработки (TX) и контрольной (C) группой по формуле: %TGI = 1 - (TX_{конец} - TX_{начало})/(C_{конец} - C_{начало}). Процент регрессии опухоли определяли как процентную долю уменьшения опухоли у подвергнутых обработке животных относительно объема опухоли в день 0 (день введения начальной дозы), рассчитываемую в конечной точке исследования по следующей формуле: % регрессии = (TX_{конечное среднее} - TX_{начальное среднее})/(TX_{начальное среднее}) x 100.

8.2. Результаты и выводы

Как показано на **фиг. 12**, как высокоаффинный ADC QD6/B09-AZ1508 к EGFR-cMET, так и вариант RAA22/B09-AZ1508 с пониженной аффинностью к EGFR индуцировали подавление или регрессию роста опухоли в многочисленных протестированных моделях на основе PDX. Неожиданно ADC с пониженной аффинностью показали общую тенденцию к увеличению числа и глубины наблюдаемых ответов по сравнению с ADC с более высокой аффинностью. Данная тенденция активности была слегка обращенной для моделей на основе PDX, которые были наименее чувствительны к ADC с пониженной аффинностью, что в некоторой степени коррелировало с более низкой экспрессией cMET. Данные наблюдения указывают на возможность того, что активность ADC к EGFR-cMET с пониженной аффинностью частично обусловлена уровнями экспрессии cMET. EGFR-

связывающее плечо обоих биспецифических антител получали из одного и того же перекрестно-реактивного антитела к EGFR мыши (см. **пример 1**). Собственная аффинность связывания антитела QD6/B09 с EGFR мыши составляла примерно 6 нМ, тогда как аффинность биспецифического антитела RAA22/B09 составляла примерно 575 нМ. Неожиданное улучшение активности при пониженной аффинности к EGFR можно было бы объяснить за счет сниженного влияния вместилища EGFR в нормальных тканях, таких как кожа, что приводит к более высокой общей экспозиции ADC в системном кровообращении. Несмотря на это, эти данные демонстрируют, что снижение аффинности в отношении EGFR у биспецифического антитела к EGFR-сMET не снижало *in vivo* эффективность полученного ADC, а неожиданно улучшало активность по сравнению с ADC с более высокой аффинностью.

8.3. *Исследование на основе PDX при различных дозах*

Дополнительный эксперимент проводили для тестирования различных доз ADC на моделях на основе PDX. Данный эксперимент проводили, как описано в примере 8.1, за исключением того, что отдельных мышей, у которых достигался объем опухоли ≥ 2 см³, исключали из исследования, а конечное измерение включали в групповое среднее значение до тех пор, пока среднее значение не достигало конечной точки объема или исследование не достигало конечной точки времени, составляющей 63 дня. Для иллюстративного исследования высокоаффинные ADC QD6/B09-AZ1508 к EGFR-сMET тестировали при уровнях дозы, составляющих 1 и 2 мг/кг, а вариант RAA22/B09-AZ1508 с пониженной аффинностью к EGFR тестировали при 1, 2 и 3 мг/кг.

Как продемонстрировано на **фиг. 13**, как высокоаффинный ADC QD6/B09-AZ1508 к EGFR-сMET, так и вариант RAA22/B09-AZ1508 с пониженной аффинностью к EGFR индуцировали активность, подавляющую рост опухоли, в моделях на основе PDX при протестированных дозах. В соответствии с результатами, описанными в примере 8.2 и показанными на **фиг. 12**, ADC с пониженной аффинностью в целом был более эффективным, чем высокоаффинный ADC. Во всех четырех протестированных моделях ADC с пониженной аффинностью индуцировал регрессию при уровнях дозы 2 или 3 мг/кг, демонстрируя, что ADC с пониженной аффинностью является эффективным при умеренных дозах. Эти данные обеспечивают дополнительные доказательства того, что снижение аффинности биспецифического антитела к EGFR-сMET в отношении EGFR не снижает *in vivo* эффективность полученного ADC, а повышает *in vivo* эффективность по сравнению с ADC с более высокой аффинностью.

ПРИМЕР 9. Эффективность ADC в ортотопической модели на основе PDX поджелудочной железы

Подкожные *in vivo* модели опухолей являются главным направлением для исследования эффективности противораковых средств. Однако, данное место имплантации опухоли сопровождается целым рядом ограничений, которые необходимо учитывать при интерпретации результатов *in vivo*. Данные недостатки включают васкуляризацию опухоли и отсутствие тканеспецифической стромы при росте и ответе опухоли. Для устранения данных проблем авторы настоящего изобретения сравнивали *in vivo* эффективность как высокоаффинных, так и низкоаффинных биспецифических конъюгатов антитело-лекарственное средство к EGFR-сMET как в подкожных, так и в ортотопических моделях, представляющих собой модель на основе PDX поджелудочной железы MEDI-PANC-08. Для отслеживания роста данной опухоли в ортотопических условиях авторы настоящего изобретения разработали вариант PDX, экспрессирующий люциферазу (MEDI-PANC-08^{LUC}), рост которого можно было отслеживать с использованием визуализации.

9.1. Способы

Все эксперименты проводили в аккредитованном AAALAC (Ассоциация по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных) учреждении в соответствии с руководствами IACUC (Институционального комитета по содержанию и использованию животных) компании MedImmune по гуманному обращению и уходу за лабораторными животными. Ежедневно у животных контролировали клинические проявления и наступление смертельного исхода.

Подкожная модель на основе PDX

Модель на основе PDX поджелудочной железы, MEDI-PANC-08, используемая в данном исследовании, взята из собственной библиотеки PDX компании MedImmune. Опухоль PDX изначально размножали на затравочных мышах NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) для получения достаточного количества опухолевого материала для посева в исследовании эффективности. После достижения объема опухоли 800-1200 мм³ мышей гуманно умерщвляли путем асфикции в атмосфере CO₂. Опухоли выделяли в стерильных условиях, нарезали на кусочки размером ~2 мм³ и имплантировали подкожно в правый бок отдельных мышей NSG с помощью троакарной иглы 11-го калибра. После достижения опухоли размера ~150-250 мм³ мышей рандомизировали (в зависимости от объема опухоли) на группы обработки и обрабатывали с помощью ADC (Q1Wx4). Исследовали два биспецифических ADC к EGFR-сMET, QD6/B09 (высокоаффинный) и RAA2/B09 (низкоаффинный), при 1, 2 и 3 мг/кг. Также тестировали ADC изотипического

контроля (R347-AZ1508) при 3 мг/кг. Все конъюгаты антитела и лекарственного средства разводили в буфере (25 mM гистидина, 7% сахарозы, 0,02% PS80, pH 6,0) непосредственно перед применением и вводили *i.v.* в хвостовую вену. Измерения опухоли и веса тела проводили два раза в неделю, и объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения $(L \times W^2)/2$, где *L* и *W* относятся к величинам длины и ширины соответственно.

Ортотопическая модель на основе PDX

Модель на основе PDX, экспрессирующего люциферазу (MEDI-PANC-08^{LUC}), выращивали подкожно у затравочных мышей NSG и при объеме, составляющем 800-1200 мм³, опухоли собирали и разрезали на фрагменты, составляющие примерно 2 мм³. Затем фрагменты опухоли пришивали к поджелудочной железе мышей NSG (нулевой день). Люциферазный сигнал определяли еженедельно с использованием *in vivo* системы визуализации IVIS Spectrum. Вкратце, за 10 минут до визуализации внутрибрюшинно (*i.p.*) вводили 200 мкл люциферина, растворенного в DPBS (15 мг/мл). Мышей анестезировали 3% изофлураном, укладывали на правый бок и измеряли люминесценцию. Через четырнадцать дней после имплантации опухоли, когда люминесцентный сигнал стал четко обнаруживаемым, мышей рандомизировали на соответствующие группы на основании люминесценции. Мышей обрабатывали изотипическим контролем (R347-AZ1508, 3 мг/кг – Q1Wx4), гемцитабином (75 мг/кг, Q2Dx5) и ADC RAA2/B09 (2 и 3 мг/кг – Q1Wx4). Люминесценцию измеряли еженедельно. Конечные точки исследования включали потерю веса тела, ухудшение состояния организма и летаргию. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Living Image (Perkin Elmer) и наносили на график в виде зависимости среднего излучения [ф/с/см²/ср] от времени.

9.2. Результаты и обсуждение

Для облегчения выбора подходящей комбинации аффинности к EGFR для биспецифического ADC к EGFR-сMET высокоаффинные и низкоаффинные биспецифические ADC к EGFR-сMET сравнивали в исследовании *in vivo* эффективности с применением модели на основе PDX поджелудочной железы, MEDI-PANC-08. Как показано на панелях А и В **фиг. 14**, между 2 молекулами наблюдалась несопоставимая разница. Высокоаффинный ADC QD6/B09 не показал эффективности ни при одном из 3 протестированных уровней дозы. И наоборот, низкоаффинный ADC RAA2/B09 вызывал полную регрессию опухоли к дню 65 с последующим повторным ростом опухоли при уровне дозы 3 мг/кг и подавлением роста опухоли при 2 мг/кг.

Хотя подкожные модели опухолей стали рабочей лошадкой для исследований *in vivo* эффективности, их основным недостатком является то, что опухоли не растут в месте их происхождения, и, следовательно, любой ответ на лекарственное средство может не

отражать, как пациенты будут отвечать в действительности. Для решения данной проблемы разработали ортотопическую модель рака поджелудочной железы с использованием опухоли MEDI-PANC-08, которую трансгенно модифицировали для стабильной экспрессии люциферазы. После хирургической имплантации на поджелудочную железу опухолям давали возможность сформироваться, и впоследствии их рандомизировали на основании люминесцентного сигнала. Затем мышью обрабатывали либо низкоаффинным ADC RAA2/B09 к EGFR-сMET, либо изотипическим контролем, либо гемцитабином (химиотерапевтическое лекарственное средство). После обработки еженедельно измеряли люминесценцию. Как показано на панели С **фиг. 14**, люминесценция в группе без обработки и группе изотипического контроля увеличивается с течением времени, при этом животных исключают из исследования вследствие плохого физического состояния и крупных, пальпируемых опухолей в брюшной полости. Для гемцитабина показано первоначальное снижение люминесцентного сигнала, достигающее минимума в примерно день 21, после чего сигнал увеличивался с течением времени, при этом группу исключили из исследования в день 49. В ортотопической модели оба уровня дозы 2 и 3 мг/кг ADC RAA2/B09 вызывали снижение люминесцентного сигнала, достигающего практически фоновых уровней к дню 60. При сравнении с результатами исследования подкожной опухоли уровень дозы 2 мг/кг продемонстрировал лучшую активность, вызывающую регрессию опухоли. При вскрытии в конце исследования животных, у которых были показаны опухоли с люминесцентными сигналами, близкими к фоновым, видимую опухоль более не наблюдали, что подтверждает корреляцию между люминесцентным сигналом и объемом опухоли.

В заключение необходимо отметить, что низкоаффинный ADC RAA2/B09 к EGFR-сMET продемонстрировал улучшенную эффективность по сравнению с высокоаффинным ADC QD6/B09 в подкожной модели PDX на основе PDX поджелудочной железы, при этом регрессию опухоли наблюдали при 3 мг/кг. Данную эффективность также наблюдали на ортотопической модели с использованием той же опухоли PDX (MEDI-PANC-08), сконструированной для стабильной экспрессии люциферазы. При использовании люминесценции в качестве косвенного показателя объема опухоли ADC RAA2/B09 показал более высокую эффективность по сравнению с подкожной моделью, приводя к регрессии опухоли как при 2, так и при 3 мг/кг.

ПРИМЕР 10. Безопасность и фармакокинетика

Фармакокинетические (ПК) анализы проводили для сравнения у низко- и высокоаффинного ADC к EGFR-сMET параметров ПК в плазме крови, в том числе пиковой и общей экспозиции, клиренса и периода полужизни у мышей и яванских

макаков. Ключевой целью было определить, повлияет ли снижение аффинности к EGFR на экспозицию биспецифического ADC к EGFR-сMET в системном кровообращении. Образцы для оценки PK собирали у мышей и яванских макаков как для QD6/B09-57-AZ1508, так и для RAA/B09-57-AZ1508 при различных уровнях дозы. Проводили некомпартментный анализ для оценки параметров PK для QD6/B09-57-AZ1508 и RAA22/B09-57-AZ1508 на основании общих концентраций ADC для разных разновидностей и уровней дозы.

В целом, RAA22/B09-57-AZ1508 показывает более высокую экспозицию и более длительный период $t_{1/2}$ по сравнению с QD6/B09-57-AZ1508 как у мышей, так и у яванских макаков, что позволяет предположить улучшенную PK у RAA22/B09-57-AZ1508 с более низкой аффинностью.

10.1. Биоанализ результатов доклинического PK-анализа

Концентрацию целевых соединений (QD6/B09-57-AZ1508 и RAA22/B09-57-AZ1508) и общую концентрацию антител измеряли с помощью одного анализа методом LC-MS/MS с иммунозахватом. Вкратце, поликлональное антитело к антителам человека конъюгировали с магнитными гранулами. Затем 25 мкл образца плазмы крови разводили в PBS и инкубировали вместе с магнитными гранулами. После захвата магнитные гранулы несколько раз промывали перед расщеплением трипсином в присутствии внутренних стандартов. Реакцию расщепления останавливали с помощью добавления кислоты. Затем жидкое содержимое переносили на планшет для инъекций.

Сигнатурный триптический пептид в области Fc антитела человека и отщепленный поражающий элемент разделяли с использованием обращенно-фазовой хроматографии (RPLC) с последующим обнаружением с использованием мониторинга множественных реакций (MRM). Сигнатурный пептид в области Fc использовали для расчета общего Ab, тогда как поражающий элемент, высвобождающийся при расщеплении, использовали для расчета ADC. Внутренним стандартом, используемым в данном эксперименте, является меченный изотопом пептид или белок (SiluMAb, Sigma-Aldrich) или меченный изотопом поражающий элемент. Соотношение площади пика анализируемого материала к внутренним стандартам использовали для расчета относительно стандартной кривой.

Стандартные кривые и результаты QC получали путем внесения целевых соединений на разных уровнях в ту же матрицу, что и образцы. Диапазон количественной оценки охватывает от 100 нг/мл до 15000 нг/мл, при этом разведения при QC охватывают до 525000 нг/мл. Стандартную кривую строили путем подгонки с помощью простейшей возможной модели. Точность и прецизионность анализа находятся в пределах 20% для

всех уровней, за исключением нижнего предела количественного определения (LLOQ), для которого они составляют 25%.

10.2. PK-анализ QD6/B09-57-AZ1508 у мышей

Результаты исследований на мышах, включенные в анализ NCA, обобщены в **таблице 4**.

Таблица 4. Перечень исследований RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 на мышах

Исследование	Название исследования	Дизайн исследования
03-EGFR cMET-ADC-ПК -15-003-А	Фармакокинетическое исследование cMET-EGFR-AZ1508 на "голых" мышах (QD6/B09-57-AZ1508)	Однократная IV доза на уровне 1, 3, 5 и 10 мг/кг; сбор плазмы крови через 0,5, 4, 24, 48, 72, 144 и 240 ч; анализ методом LC-MS/MS для определения ADC и общего Ab
ПК-исследование RAA22/B09-AZ1508 на мышах – октябрь 2016 г.	Фармакокинетическое исследование DuetMAb RAA22/B09-AZ1508 к cMET-EGFR на "голых" мышах	Однократная IV доза на уровне 0,5, 1, 3, 5 и 10 мг/кг; сбор плазмы крови через 0,5 ч, 4 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня, 6 дней, 10 дней и 14 дней; анализ методом LC-MS/MS для определения ADC и общего Ab

Профили средней PK концентрации в зависимости от времени у мышей для RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 представлены на **фиг. 15**.

Как RAA22/B09-57-AZ1508, так и QD6/B09-57-AZ1508 демонстрировали линейную PK у мышей при протестированных уровнях дозы, с дозопропорциональной экспозицией (C_{max} и AUC), сопоставимыми CL и $t_{1/2}$, наблюдаемыми при дозах от 0,5 мг/кг до 10 мг/кг для RAA22/B09-57-AZ1508 и от 1 мг/кг до 10 мг/кг для QD6/B09-57-AZ1508 соответственно.

Сравнение PK между RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 оценивали при уровнях дозы 1, 3, 5, 10 мг/кг, которые тестировали для обоих соединений, а средние параметры PK по результатам NCA обобщены в **таблице 5**. Результаты продемонстрировали более медленный CL, более высокую экспозицию и удлиненный $t_{1/2}$ в случае RAA22/B09-57-AZ1508, при этом средняя AUC RAA22/B09-57-AZ1508 показала 2–2,91-кратное увеличение по сравнению с QD6/B09-57-AZ1508; средний $t_{1/2}$ находился в диапазоне от 4,24 до 6,38 дня для RAA22/B09-57-AZ1508 и от 2,57 до 3,33 дня для QD6/B09-57-AZ1508, что представляет 1,27–2,32-кратное увеличение $t_{1/2}$ для RAA22/B09-57-AZ1508.

Таблица 5. Средние параметры РК по результатам NCA по уровням доз между RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 у мышей

Доза (мг/кг)	1 мг/кг		3 мг/кг		5 мг/кг		10 мг/кг	
	RAA22 /B09- 57- AZ1508	QD6/B 09-57- AZ1508	RAA22 /B09- 57- AZ1508	QD6/B 09-57- AZ1508	RAA22 /B09- 57- AZ1508	QD6/B 09-57- AZ1508	RAA22 /B09- 57- AZ1508	QD6/B 09-57- AZ1508
C_{max} (мг/мл)	12,8	11,3	51,1	31,0	90,7	44,8	198	134
AUC (мг*ден ь/мл)	41,0	20,5	136	57,5	230	87,9	494	170
t_{1/2} (день)	5,97	2,57	4,24	3,33	6,38	3,28	5,31	2,95
CL (мл/кг/д ень)	20,8	45,7	20,0	46,9	18,5	50,8	17,3	53,8

10.3. PK-анализ QD6/B09-57-AZ1508 у яванских макаков

Результаты исследований на яванских макаках, включенные в анализ NCA, обобщены в **таблице 6.**

Таблица 6. Перечень исследований RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 на яванских макаках

Исследов ание	Название исследования	Дизайн исследования
20102256	RAA22/B09-Maia-AZ1508: Исследование токсичности повторных внутривенных доз для оценки безопасности и фармакокинетики у яванских макаков	IV болюсная инъекция Q3 Wk x 2
20067678	8-недельное исследование по определению диапазона доз EGFR cMET при внутривенной болюсной	IV болюсная инъекция Q3 Wk x 3

	инъекции у яванских макаков	
20067312	8-недельное исследование с однократной возрастающей дозой ADC к EGFR-cMet (EGFRcMet-1508) при внутривенном пути введения у яванских макаков	IV введение однократной возрастающей дозы

Профили средней PK концентрации в зависимости от времени у яванских макаков для RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 представлены на **фиг. 16**.

RAA22/B09-57-AZ1508 проявлял линейную PK у яванских макаков при дозах от 2 мг/кг до 5 мг/кг, при этом наблюдали дозопропорциональную экспозицию (C_{max} и AUC), сопоставимые CL и $t_{1/2}$.

QD6/B09-57-AZ1508 проявлял нелинейную PK у яванских макаков при дозах от 0,67 мг/кг до 3 мг/кг при этом наблюдали более чем дозопропорциональную экспозицию (C_{max} и AUC), а также более быстрый CL и более короткий $t_{1/2}$ при более низких уровнях дозы.

Сравнение PK между RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 у яванских макаков оценивали при уровнях дозы 2 и 3 мг/кг, которые были тестировали для обоих соединений, а средние параметры PK по результатам NCA обобщены в **таблице 7**. Результаты продемонстрировали более медленный CL, более высокую экспозицию и удлиненный $t_{1/2}$ в случае RAA22/B09-57-AZ1508, при этом средняя AUC RAA22/B09-57-AZ1508 показала 1,90–2,43-кратное увеличение по сравнению с QD6/B09-57-AZ1508; средний $t_{1/2}$ составлял от 4,30 до 5,90 дня для RAA22/B09-57-AZ1508 и от 0,969 до 1,07 дня для QD6/B09-57-AZ1508, что представляет в 4,44–5,51-кратное увеличение $t_{1/2}$ для RAA22/B09-57-AZ1508.

Таблица 7. Средние параметры PK по результатам NCA по уровням дозы между RAA22/B09-57-AZ1508 и QD6/B09-57-AZ1508 у обезьян

Доза (мг/кг)	2 мг/кг		3 мг/кг	
	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508*	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508
C_{max} (мг/мл)	59,1	47,5	86,6	73,3
AUC	116	47,6	179	94,4

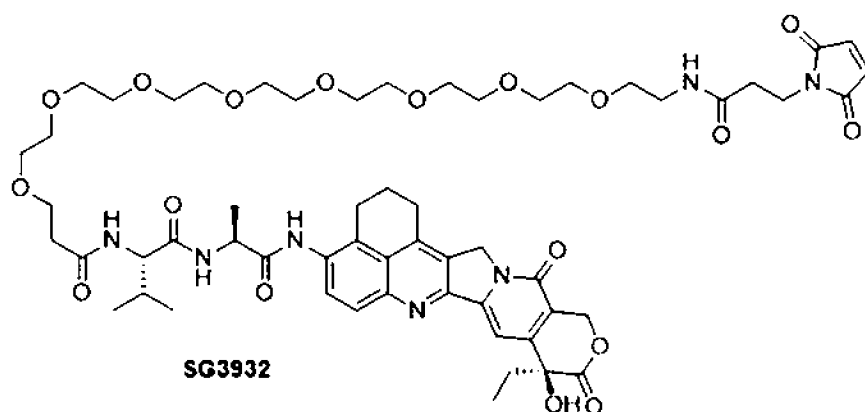
(мг*день/мл)				
t _{1/2} (день)	5,90	1,07	4,30	0,969
CL (мл/кг/день)	16,7	42,2	16,5	31,6

В совокупности эти данные демонстрируют, что низкоаффинный RAA22/B09-57-AZ1508 показывает более высокую экспозицию и увеличенный период полужизни в системном кровообращении по сравнению с высокоаффинным QD6/B09-57-AZ1508 как у мышей, так и у яванских макаков. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что снижение аффинности к EGFR уменьшает связывание с EGFR, присутствующим в нормальной ткани, тем самым уменьшая влияние вместилища в нормальной ткани и улучшая параметры PK в плазме крови.

ПРИМЕР 11. ADC с ингибитором топоизомеразы I в качестве полезной нагрузки

Разработали эксперимент для тестирования эффективности и безопасности биспецифической молекулы RAA22/B09-57, конъюгированной с другой полезной нагрузкой — ингибитором топоизомеразы I, а не тубулизином, использованным в предыдущих примерах.

Биспецифическое антитело DuetMab RAA22/B09 (с цистеиновой вставкой "Maia" после серина 239), полученное в соответствии с примером 1, конъюгировали с ингибитором топоизомеразы SG3932 посредством "классической" конъюгации с нативными цистеинами в биспецифическом антителе.



Эффективность ADC к EGFR/cMET с ингибитором топоизомеразы I исследовали с использованием испытания на основе PDX. Испытание на основе PDX проводили фактически так же, как описано выше для примера 8, с использованием ряда различных моделей на основе PDX, полученных из опухолей поджелудочной железы, толстой кишки, NSCLC и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SQHN). Животным вводили

однократную дозу Maia Торо ADC к EGFR-сMET при 10 мг/кг. Результаты испытания на основе PDX с использованием Maia Торо ADC к EGFR-сMET представлены на фиг. 17.

Как показано на фиг. 17, Maia Торо ADC к EGFR-сMET индуцировал подавление или регрессию роста опухоли в многочисленных протестированных моделях на основе PDX. Таким образом, данные результаты демонстрируют, что ADC RAA22/B09-57, содержащий ингибитор топоизомеразы I, был эффективен на моделях на основе PDX, представляющих несколько типов опухолей.

ПРИМЕР 12. Мутации для улучшения РК ADC

В ADC с ингибитором топоизомеразы I, полученном и протестированном в примере 11, использовали биспецифическое антитело RAA22/B09, содержащее цистеиновую вставку "Maia" после серина 239. Однако с учетом, что SG3932 конъюгируется с нативными цистеинами, цистеиновая вставка Maia не является необходимой. Поэтому авторы настоящего попытались модифицировать Maia Торо ADC RAA22/B09, полученный в примере 11, с удалением данной цистеиновой вставки.

Также признано, что потенциально можно смягчить иммунную токсичность и улучшить фармакокинетику, если уменьшить или устранить эффекторные функции Fc-остова. Поэтому авторы настоящего изобретения также вводили "тройную мутацию (TM)" L234F/L235E/P331S (EU-нумерация), которая, как было показано ранее, уменьшает эффекторные функции Fc в молекулах антител (Organesyan, 2008; Hay, 2016).

Новая созданная молекула "EGFR-сMET TM", содержащая переменные области из RAA22 и B09, с удаленной мутацией 239i и введенной TM, имеет аминокислотные последовательности, представленные в следующей таблице:

	EGFR-сMET TM
Тяжелая цепь к EGFR	59
Тяжелая цепь к с-Met	60
Легкая цепь к EGFR	61
Легкая цепь к с-Met	62

Чтобы осуществить конъюгацию с SG3932, 50 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕФ) в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4 (PBS), добавляли (12,5 молярного эквивалента/антитело) к раствору биспецифического антитела к EGFR-сMET TM в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ

этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), при конечной концентрации антитела ~3 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли инкубироваться при 37°C в течение 2 часов в орбитальном шейкере при слабом (60 об./мин) встряхивании. Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры в течение 45 минут. Затем добавляли SG3932 в виде раствора в DMSO (12,5 молярного эквивалента/антитело) для получения конечной концентрации DMSO 10% (об./об.). Раствор инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем гасили добавлением *N*-ацетилцистеина (5 микромолей/SG3932) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакционную смесь фильтровали с использованием 0,2-мкм стерилизующего фильтра, а затем выдерживали при 2-8°C на протяжении ночи. Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки для тангенциальной проточной фильтрации (TFF) с использованием mPES, 30-кДа волоконного фильтра MidiKros® с площадью поверхности 375 см², в буфер, содержащий 30 мМ гистидина, 30 мМ аргинина, pH 6,8. Степень удаления свободного лекарственного средства отслеживали с помощью UHPLC-RP с использованием чистого конъюгата. После полного удаления свободного лекарственного средства для ADC проводили замену буфера. ADC фильтровали с использованием 0,22-мкм фильтра в стерильной атмосфере, а затем добавляли полисорбат-80 до конечной концентрации 0,02% (вес/об.).

Анализ методом UHPLC на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Thermo Scientific MAbPac 50 мм x 2,1 мм при элюировании градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце ADC при длине волны 214 нм и 330 нм (специфическая для SG3932) выявил соотношение лекарственного средства на антитело (DAR), составляющее 6,0 молекул SG3932 на антитело.

Эффективность ТМ ADC к EGFR-сMET исследовали с использованием испытания на основе PDX. Испытание на основе PDX проводили фактически так же, как описано выше для примера 8, с использованием спектра различных моделей на основе PDX, полученных из опухолей поджелудочной железы, толстой кишки, NSCLC и SQHN. Животным вводили однократную дозу ТМ ADC к EGFR-сMET в дозе 5 мг/кг. Результаты испытания на основе PDX с использованием ТМ ADC к EGFR-сMET представлены на **фиг. 18**. Результаты данного эксперимента демонстрируют, что ТМ ADC к EGFR-сMET был способен индуцировать подавление или регрессию роста опухоли в многочисленных протестированных моделях на основе PDX.

Эффективность ТМ ADC к EGFR-сMET ("ТМ ADC") сравнивали с Maia Торо ADC к EGFR-сMET ("Maia ADC"), полученным в примере 11, в моделях на основе PDX SQHN-02 и PANC-08. Животным вводили дозы 2,5 мг/кг, 5 мг/кг или 10 мг/кг каждого ADC и

отслеживали рост опухоли. В данный эксперимент также включали не подвергавшееся обработке контрольное животное ("без обработки ") и животное, которому вводили неконъюгированное ТМ антитело к EGFR-сMET (ТМ mAb). Результаты представлены на **фиг. 19**.

Результаты демонстрируют, что как ТМ ADC к EGFR-сMET, так и Maia Торо ADC к EGFR-сMET одинаково эффективны ("эквивалентны") в уменьшении роста опухоли/индуцировании регрессии опухоли в диапазоне протестированных доз. Это позволяет предположить, что удаление мутации S239i и устранение эффекторных функций Fc с использованием тройного мутанта не оказывает отрицательного влияния на эффективность в данных моделях опухолей.

Также было показано, что ТМ ADC к EGFR-сMET является эффективным в уменьшении роста опухоли в опухолях NSCLC, которые экспрессируют либо EGFR дикого типа, либо мутантный EGFR. Результаты демонстрируют, что ТМ ADC к EGFR-сMET является активным в моделях на основе PDX как с EGFR дикого типа, так и с мутантной молекулой, и данные результаты представлены на **фиг. 20**. Это является преимуществом, поскольку указывает на то, что ADC смогут обеспечить пользу в различных терапевтических условиях и по всему спектру различных генотипов EGFR.

Наконец, на мышах NOD-SCID проводили фармакокинетические (PK) исследования для сравнения ТМ ADC к EGFR-сMET ("ТМ ADC") и Maia Торо ADC к EGFR-сMET ("Maia ADC"), полученных в примере 11. Эксперимент проводили в основном так, как описано в примере 10.

Репрезентативные результаты данных PK-исследований представлены на **фиг. 21**. Как представлено на данной фигуре, ТМ ADC к EGFR-сMET проявлял больший период полужизни ($t_{1/2}$ составляет 5,0 дня) и сниженный клиренс лекарственного средства (CL составляет 14,8 мл/день/кг) по сравнению с Maia Торо ADC к EGFR-сMET ($t_{1/2}$ составляет 3,0 дня; CL составляет 39,7 мл/день/кг). Таким образом, результаты указывают на то, что описанный в данном документе ТМ ADC к EGFR-сMET показывает улучшенную PK по сравнению с Maia Торо ADC к EGFR-сMET, полученным в примере 10. Аналогичное улучшение PK наблюдали также при сравнении неконъюгированного ТМ антитела к EGFR-сMET ("ТМ mAb") с неконъюгированным Maia к EGFR-сMET ("Maia ADC").

ПРИМЕР 13. Дегградация рецепторов EGFR и cMet после обработки с помощью ADC к EGFR-сMET TOP1i ТМ

Опосредованную антителами дегградацию рецепторов осуществляли с помощью вестерн-блот-анализа следующим образом.

Клетки пула HCC827 GR высевали в 12-луночные культуральные планшеты (Corning/Costar) из расчета 6×10^5 клеток/лунку в 2 мл среды RPMI (Gibco), содержащей 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HI FBS, Gibco). Клетки оставляли прикрепляться и расти на протяжении ночи при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 . На следующий день утром ростовую среду осторожно аспирировали и клетки обрабатывали с помощью 1 мл свежей ростовой среды, содержащей тестируемые mAb, указанные в таблице 9, каждое при конечной концентрации, составляющей 10 микрограммов на мл. Клетки инкубировали при 37°C в ростовой камере с повышенной влажностью в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 часов. Затем среду осторожно аспирировали и клетки один раз промывали с помощью 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко без кальция и магния (DPBS). Клетки лизировали путем добавления 150 микролитров реагента для экстракции белков млекопитающих M-per (Thermo Scientific), содержащего полный коктейль ингибиторов протеаз (Roche) и коктейль ингибиторов фосфатаз PhosStop (Roche). Для содействия более полному лизису планшеты переносили в условия -80°C и подвергали одному циклу замораживания-оттаивания. Полученные лизаты переносили в микроцентрифужные пробирки и клеточный дебрис удаляли центрифугированием в течение 10 минут на максимальной скорости (14000 об./мин) при 4°C в микроцентрифуге, супернатант переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и хранили при -80°C до анализа. Концентрацию белка измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (Thermo Scientific).

Для вестерн-блот-анализа при подготовке образцов использовали 4-кратный LDS (Invitrogen) и 10-кратный восстановитель образцов (Invitrogen) для достижения конечной концентрации белка 10 микрограммов белка (1-кратный LDS и 1-кратный восстановитель образцов) в объеме 16 микролитров. Образцы нагревали в течение 10 минут при 95°C , затем охлаждали до комнатной температуры и кратковременно центрифугировали. 10 микрограммов белка на образец наносили на 4-12% гели Bis-Tris (NuPage, Invitrogen) в буфере MOPS и подвергали электрофорезу в течение одного часа при постоянном напряжении 200 В. Разделенные белки переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PDVF) с использованием устройства для переноса iBlot (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Блоты блокировали безбелковым блокирующим буфером T20 Пирса (PBS) (Thermo Scientific) в течение одного часа при комнатной температуре. Затем инкубировали с первичным специфическим антителом на протяжении ночи при 4°C [(разведения общего cMET 1:4500; разведение общего EGFR 1:2500 и бета-актина 1:15000] (Cell Signaling Technologies) в блокирующем буфере. Специфически связавшиеся антитела обнаруживали с помощью вторичных антител,

меченных пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch), с использованием реагента SuperSignal West Dura ECL (Pierce/Thermo Scientific). Изображения получали с помощью GE Imagequant LAS 4000.

Таблица 9. Тестируемые mAb, использованные для анализа деградации рецепторов

Реагент	Описание
hIgG R347-TM	Контрольный IgG
mAb RAA22/R347 к EGFR	mAb к EGFR с "холостым" плечом, содержащее EGFR-связывающие домены VH и VL под SEQ ID NO: 18 и 20 соответственно, и последовательности доменов VH и VL R347 вместо cMet-связывающего плеча и без полезной нагрузки TOP1i
mAb B09/R347 к cMET	MAb к cMet с "холостым" плечом, содержащее cMET-связывающие домены VH и VL под SEQ ID NO: 38 и 40 соответственно, и последовательности доменов VH и VL R347 вместо EGFR-связывающего плеча и без полезной нагрузки TOP1i
Биспецифическое mAb к EGFR/cMET	содержащее EGFR-связывающие домены VH и VL под SEQ ID NO: 18 и 20 соответственно, и cMet-связывающие домены VH и VL под SEQ ID NO: 38 и 40 соответственно, но без полезной нагрузки TOP1i
TOP1i TM ADC к EGFR-cMet	содержащее 1 ⁻¹⁰ тяжелую цепь под SEQ ID NO: 59, 2 ⁻¹⁰ тяжелую цепь под SEQ ID NO: 60, 1 ⁻¹⁰ легкую цепь под SEQ ID NO: 61 и 2 ⁻¹⁰ легкую цепь под SEQ ID NO: 62 плюс полезную нагрузку TOP1i SG3932

Амивантамаб	как описано, например, в пункте 1 из US9593164B2
-------------	--

Результаты, показанные на фиг. 22, указывают на то, что mAb с "холостым" плечом R347 или их комбинация не индуцируют значительной понижающей модуляции рецептора, в то время как биспецифические антитела индуцируют ее. Это согласуется с гипотезой о том, что интернализация mAb является оптимальной, когда происходит взаимодействие с обеими мишенями EGFR и cMet. Более того, mAb к EGFR-cMET, по-видимому, вызывает некоторую деградацию cMet и деградацию EGFR в сопоставимой степени с TOP1i TM ADC к EGFR-cMet. Кроме того, TOP1i TM ADC к EGFR-cMet, по-видимому, индуцирует большую деградацию cMet, чем амивантамаб (недавно одобренное биспецифическое средство к EGFR-cMet, который, как сообщается, индуцирует деградацию рецепторов).

Список литературы

Ряд публикаций процитированы выше для более полного описания и раскрытия настоящего изобретения и существующего уровня в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Полные цитирования для этих литературных источников приведены ниже. Содержание каждой из этих литературных источников полностью включено в данный документ.

Altschul, 1990	Altschul, S.F. et al., <i>Basic local alignment search tool.</i> , J Mol Biol. 1990, 215(3):403-10.
Altschul, 1997	Altschul, S.F. et al. <i>Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.</i> Nucl. Acids Res., 1997, 25 3389-3402
Andreev, 2017	Andreev, J., et al., <i>Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Bridging HER2 and Prolactin Receptor Improve Efficacy of HER2 ADCs.</i> Molecular cancer therapeutics, 2017.
Angevin, 2017	Angevin, E., et al., <i>Phase I study of ABBV-399, a c-Met antibody-drug conjugate (ADC), as monotherapy and in combination with erlotinib in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC).</i> Journal of Clinical Oncology, 2017. 35 (15_suppl): p. 2509-2509.
Ariyawutyakorn, 2016	Ariyawutyakorn, W., S. Saichaemchan, and M. Varella-Garcia, <i>Understanding and Targeting MET Signaling in Solid Tumors - Are We There Yet?</i> Journal of Cancer, 2016. 7 (6): p. 633-649.

Arteaga, 2014	Arteaga, C.L. and J.A. Engelman, <i>ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics</i> . Cancer Cell, 2014. 25 (3): p. 282-303.
Bachleitner-Hofmann, 2008	Bachleitner-Hofmann, T., et al., <i>HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells</i> . Mol Cancer Ther, 2008. 7 : p. 3499-3508.
Bagshawe, 1991	Bagshawe et al. <i>Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites</i> . Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 1991, 4 : 915-922
Bardelli, 2013	Bardelli, A., et al., <i>Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer</i> . Cancer Discovery, 2013. 3 (6): p. 658-673.
Bardia, 2017	Bardia et al. <i>Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer</i> . J Clin Oncol. 2017, 35 (19):2141-2148
Bean, 2007	Bean, J., et al., <i>MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104 (52): p. 20932-20937.
Beck, 2017	Beck, A., et al. <i>Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates.</i> , Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16 , pp. 315-337
Belalcazar, 2010	Belalcazar, A., et al., <i>Targeting the Met pathway in lung cancer</i> . Expert review of anticancer therapy, 2012. 12 (4): p. 519-528.
Benedettini, 2010	Benedettini, E., et al., <i>Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis</i> . The American journal of pathology, 2010. 177 (1): p. 415-423.
Bertotti, 2015	Bertotti, A. and F. Sassi, <i>Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies</i> . Clinical Cancer Research, 2015.
Birchmeier, 2003	Birchmeier, C., et al., <i>Met, metastasis, motility and more</i> . Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4 : p. 915-925.
Boccaccio, 2014	Boccaccio, C., P. Luraghi, and P.M. Comoglio, <i>MET-Mediated Resistance</i>

	<i>to EGFR Inhibitors: An Old Liaison Rooted in Colorectal Cancer Stem Cells</i> . 2014. p. 3647-3651.
Bouattour, 2018	Bouattour, M., et al., <i>Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma</i> . Hepatology (Baltimore, Md.), 2018. 67 (3): p. 1132-1149.
Bouchard, 2014	Bouchard, H., C. Viskov, and C. Garcia-Echeverria, <i>Antibody-drug conjugates-a new wave of cancer drugs</i> . Bioorg Med Chem Lett, 2014. 24 (23): p. 5357-63.
Brinkmann, 2017	Brinkmann, U. and R.E. Kontermann, <i>The making of bispecific antibodies</i> . MAbs, 2017. 9 (2): p. 182-212.
Calvo, 2017	Calvo, E., et al., <i>Preliminary results from a phase I study of the antibody-drug conjugate ABBV-221 in patients with solid tumors likely to express EGFR</i> . Journal of Clinical Oncology, 2017. 35 (15_suppl): p. 2510-2510.
Cappuzzo, 2009	Cappuzzo, F., et al., <i>Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (10): p. 1667-74.
Cardillo, 2015	Cardillo et al. <i>Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers</i> . Bioconj Chem., 2015, 26(5):919-31
Cecchi, 2012	Cecchi, F., D.C. Rabe, and D.P. Bottaro, <i>Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert opinion on therapeutic targets, 2012. 16 (6): p. 553-572.
Chan, 2017	Chan, D.L.H., et al., <i>Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer</i> . Cochrane Database Syst Rev, 2017. 6 : p. CD007047.
Chong, 2013	Chong, C.R. and P.A. Janne, <i>The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer</i> . Nature medicine, 2013. 19 (11): p. 1389-1400.
Chothia, 1987	Chothia, C. and Lesk, A.M., <i>Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins</i> . J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917
Choueiri, 2017	Choueiri, T.K., et al., <i>Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer</i> . J Clin Oncol, 2017. 35 (26): p. 2993-3001.
Comer, 2018	Comer, F., C. Gao, and S. Coats, <i>Bispecific and Biparatopic Antibody Drug Conjugates</i> , in <i>Innovations for Next-Generation Antibody-Drug</i>

	<i>Conjugates</i> , M. Damelin, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 267-280.
Corso, 2010	Corso, S., et al., <i>Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition</i> . <i>Molecular Cancer</i> , 2010. 9 (1): p. 121.
Cunningham, 2004	Cunningham, D., et al., <i>Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer</i> . <i>N Engl J Med</i> , 2004. 351 (4): p. 337-45.
De Bacco, 2012	De Bacco, F., et al., <i>The MET Oncogene Is a Functional Marker of a Glioblastoma Stem Cell Subtype</i> . <i>Cancer research</i> , 2012. 72 (17): p. 4537-4550.
de Goeij, 2016	de Goeij, B.E.C.G. and J.M. Lambert, <i>New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches</i> . <i>Antigen processing * Special section: New concepts in antibody therapeutics</i> , 2016. 40 : p. 14-23.
Dimasi, 2017	Dimasi et al. <i>Efficient Preparation of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Cysteine Insertion</i> . <i>Mol Pharmaceuticals</i> , 2017, 14 (5) 1501-1516
Dokala, 2005	Dokala, A. and S.S. Thakur, <i>Extracellular region of epidermal growth factor receptor: a potential target for anti-EGFR drug discovery</i> . <i>Oncogene</i> , 2016. 36 : p. 2337.
Domling, 2005	Domling et al. <i>Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents</i> . <i>Mol. Diversity</i> , 2005 9 :141-147
Donaghy, 2016	Donaghy, H., <i>Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates</i> . <i>MAbs</i> , 2016. 8 (4): p. 659-71.
Dornan, 2009	Dornan et al., <i>Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma</i> . <i>Blood</i> , 2009, 114 (13):2721-2729
Dubowchik, 2002	Dubowchik et al., <i>Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity</i> , <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 2002, 13 ,855-869
Engelman, 2007	Engelman, J.A., et al., <i>MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling</i> . <i>Science</i> , 2007. 316 : p. 1039-

	1043.
Fan, 2015	Fan, G.W., et al., <i>Bispecific antibodies and their applications</i> . Journal of Hematology & Oncology, 2015. 8 .
Garber, 2014	Garber, K., <i>MET inhibitors start on road to recovery</i> . Nature reviews. Drug discovery, 2014. 13 (8): p. 563-565.
Gherardi, 2013	Gherardi et al., <i>Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor</i> . Proc Natl Acad Sci U.S.A, 2003, 100(21): 12039-12044
Giordano, 1989	Giordano, S., et al., <i>Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein</i> . Nature, 1989. 339 : p. 155-156.
Gisterek, 2011	Gisterek, I., et al., <i>Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients</i> . Rep Pract Oncol Radiother, 2011. 16 (5): p. 173-7.
Gou, 2016	Gou, L.Y., et al., <i>The coexistence of MET over-expression and an EGFR T790M mutation is related to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer</i> . Oncotarget, 2016.
Guo, 2008	Guo, A., et al., <i>Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105 (2): p. 692-697.
Guo, 2014	Guo, B., et al., <i>Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures</i> . PLoS One, 2014. 9 (6): p. e99399.
Hamblett, 2004	Hamblett et al., <i>Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate</i> . Clin. Cancer Res., 2004, 10:7063-7070
Haura, 2013	Haura, E.B. and M.A. and Smith, <i>Signaling Control by Epidermal Growth Factor Receptor and MET: Rationale for Cotargeting Strategies in Lung Cancer</i> . Journal of Clinical Oncology, 2013. 31 (32): p. 4148.
Hay, 2016	Hay et al., <i>Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447</i> . Oncoimmunology, 2016 5(8):e1208875.
Hinrichs, 2015	Hinrichs, M.J. and R. Dixit, <i>Antibody Drug Conjugates: Nonclinical Safety Considerations</i> . AAPS J, 2015. 17 (5): p. 1055-64.
Huang, 2014	Huang, L., et al., <i>MET expression plays differing roles in non-small-cell lung cancer patients with or without EGFR mutation</i> . Journal of thoracic

	oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2014. 9 (5): p. 725-728.
Jimeno, 2009	Jimeno, A., et al., <i>KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (7): p. 1130-6.
Jun, 2013	Jun, H.J., R.T. Bronson, and A. Charest, <i>Inhibition of EGFR induces a c-MET driven stem cell population in Glioblastoma</i> . Stem cells (Dayton, Ohio), 2013.
Junutula, 2008	Junutula, et al., <i>Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index</i> . Nature Biotech., 2008, 26(8):925-932
Junutula, 2016	Junutula, J.R. and H.P. Gerber, <i>Next-Generation Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Cancer Therapy</i> . ACS Med Chem Lett, 2016. 7 (11): p. 972-973.
Kabat, 1991	Kabat, E.A. et al. <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991
Karamouzis, 2009	Karamouzis, M.V., P.A. Konstantinopoulos, and A.G. Papavassiliou, <i>Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors</i> . The Lancet Oncology, 2009. 10 (7): p. 709-717.
Kim, 2017a	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (68): p. 113120-113128.
Kim, 2017b	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (43): p. 75478-75487.
Kim, 2017c	Kim, J.H., et al., <i>Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (52): p. 90351-90357.
Klein, 2012	Klein et al. <i>Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies</i> . MAbs, 2012, 4:653-63
Knickelbein, 2015	Knickelbein, K. and L. Zhang, <i>Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer</i> . Genes Dis, 2015. 2 (1): p. 4-12.
Kondo, 2013	Kondo, S., et al., <i>Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma</i> . International journal of clinical

	oncology, 2013. 18 (2): p. 207-213.
Kontermann, 2015	Kontermann, R.E. and U. Brinkmann, <i>Bispecific antibodies</i> . Drug Discov Today, 2015. 20 (7): p. 838-47.
Lacouture, 2006	Lacouture, M.E., <i>Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors</i> . Nature reviews.Cancer, 2006. 6 (10): p. 803-812.
Lambert, 2017	Lambert, J.M. and C.Q. Morris, <i>Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review</i> . Adv Ther, 2017. 34 (5): p. 1015-1035.
Ledermann, 1991	Ledermann et al. <i>A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response</i> . Int. J. Cancer, 1991, 47: 659-664
LeFranc, 2015	LeFranc, M.P. et al., <i>IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on.</i> , Nucleic Acids Res. 2015, 43(Database issue):D413-22.
Li, 2011	Li, C., et al., <i>c-Met Is a Marker of Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Target</i> . Gastroenterology, 2011. 141 (6): p. 2218-2227.e5.
Liska, 2011	Liska, D., et al., <i>HGF Rescues Colorectal Cancer Cells from EGFR Inhibition via MET Activation</i> . Clinical Cancer Research, 2011. 17 (3): p. 472-482.
Liu, 2015	Liu, Y., et al., <i>Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis</i> . World J Gastroenterol, 2015. 21 (12): p. 3706-10.
Lü, 2017	Lü, Y.F. and Z.M. Wang, <i>Research progress in the technology evolution and action modes of bispecific antibodies</i> . Chinese Journal of New Drugs, 2017. 26 (20): p. 2431-2438.
Luraghi, 2014	Luraghi, P., et al., <i>MET Signaling in Colon Cancer Stem-like Cells Blunts the Therapeutic Response to EGFR Inhibitors</i> . Cancer research, 2014. 74 (6): p. 1857-1869.
Madoz-Gúrpide, 2016	Madoz-Gúrpide, J., et al., <i>Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer</i> . 2016. p. 1-13.
Marano, 2015	Marano, L., et al., <i>c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge</i> . Cancer letters, 2015. 365 (1): p. 30-36.
Mazor, 2017	Mazor, Y., et al., <i>Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating</i>

	<i>bispecific antibody binding affinity and format valence</i> . Sci Rep, 2017. 7: p. 40098.
Mazor, 2015	Mazor, Y., et al., <i>Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity</i> . MAbs, 2015. 7(3): p. 461-9.
McDermott, 2010	McDermott, U., et al., <i>Acquired Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to MET Kinase Inhibition Is Mediated by a Switch to Epidermal Growth Factor Receptor Dependency</i> . Cancer research, 2010. 70(4): p. 1625-1634.
Miyamoto, 2011	Miyamoto, M., et al., <i>Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma</i> . British journal of cancer, 2011. 105(1): p. 131-138.
Mo, 2017	Mo, H.N. and P. Liu, <i>Targeting MET in cancer therapy</i> . Chronic Dis Transl Med, 2017. 3(3): p. 148-153.
Moore, 2016	Moore, S.L., et al., <i>A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet that is Effective Against EGFR Inhibitor- Resistant Lung Tumors</i> . Cancer research, 2016.
Nasiri, 2018	Nasiri, H., et al., <i>Antibody-drug conjugates: promising and efficient tools for targeted cancer therapy</i> . J Cell Physiol, 2018.
Neuberger, 1988	Neuberger et al., 1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799
Nicholson, 2001	Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, <i>EGFR and cancer prognosis</i> . Eur J Cancer, 2001. 37: p. 9-15.
Ogitani, 2016a	Ogitani et al. <i>Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology</i> . Bioorg Med Chem Lett. 2016, 26(20):5069-5072
Ogitani, 2016b	Ogitani et al. <i>DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DMI</i> . Clin Cancer Res. 2016, 22(20):5097-5108
Organ, 2011	Organ, S.L. and M.S. Tsao, <i>An overview of the c-MET signaling pathway</i> . Therapeutic advances in medical oncology, 2011. 3(1 Suppl): p. S7-S19.
Organesyan, 2008	Organesyan et al. <i>Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions</i> . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 ;64(Pt 6):700-4.

Ou, 2016	Ou, S.-H.I., N. Agarwal, and S.M. Ali, <i>High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression</i> . Lung Cancer, 2016. 98 (Supplement C): p. 59-61.
Pearson, 1988	Pearson and Lipman, <i>Improved tools for biological sequence comparison</i> . PNAS USA, 1988, 85: 2444-2448
Persic, 1997	Persic et al. <i>An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries</i> . Gene, 1997, 187: 9-18.
Peters, 2012	Peters, S. and A.A. Adjei, <i>MET: a promising anticancer therapeutic target</i> . Nature reviews.Clinical oncology, 2012. 9 (6): p. 314-326.
Philips, 2016	Phillips, A.C., et al., <i>ABT-414, an Antibody–Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope</i> . Molecular Cancer Therapeutics, 2016. 15 (4): p. 661-669.
Philips, 2018	Phillips, A.C., et al., <i>Characterization of ABBV-221, a Tumor-Selective EGFR Targeting Antibody Drug Conjugate</i> . Mol Cancer Ther, 2018.
Prat, 1991	Prat, M., et al., <i>The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors</i> . International journal of cancer.Journal international du cancer, 1991. 49 (3): p. 323-328.
Puri, 2008	Puri, N. and R. Salgia, <i>Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer</i> . J Carcinog, 2008. 7: p. 9.
Remon, 2018	Remon, J., et al., <i>Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients</i> . Ann Oncol, 2018. 29 (suppl_1): p. i20-i27.
Retter, 2005	Retter, I., et al., <i>"VBASE2, an integrative V gene database"</i> . Nucl. Acids Res. 2005, 33 (suppl 1): D671-D674,
Rho, 2009	Rho, J.K., et al., <i>The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors</i> . Molecular cancer research : MCR, 2009. 7 (10): p. 1736-1743.
Ridgway, 1996	Ridgway et al., <i>'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization</i> . Protein Eng., 1996, 9:617-621
Rocha-Lima, 2007	Rocha-Lima, C.M., et al., <i>EGFR targeting of solid tumors</i> . Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center, 2007. 14 (3): p. 295-304.
Sacco, 2015	Sacco, J.J. and M.J. Clague, <i>Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: implications for drug targeting and resistance</i> .

	Transl Lung Cancer Res, 2015. 4 (3): p. 242-52.
Saltz, 2004	Saltz, L.B., et al., <i>Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor</i> . J Clin Oncol, 2004. 22 (7): p. 1201-8.
Sanderson, 2005	Sanderson et al., <i>In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate</i> . Clin. Cancer Res. 2005, 11:843-852
Sau, 2017	Sau, S., et al., <i>Advances in antibody-drug conjugates: A new era of targeted cancer therapy</i> . Drug Discov Today, 2017. 22 (10): p. 1547-1556.
Sellmann, 2016	Sellmann, C., et al., <i>Balancing Selectivity and Efficacy of Bispecific EGFR x c-MET Antibodies and Antibody-Drug Conjugates</i> . Journal of Biological Chemistry, 2016.
Seshacharyulu, 2012	Seshacharyulu, P., et al., <i>Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. 16 (1): p. 15-31.
Sierra, 2011	Sierra, J.R. and M.-S. Tsao, <i>c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer</i> . Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011. 3 (1 suppl): p. S21-S35.
Smith, 1981	Smith and Waterman, <i>Identification of common molecular subsequences</i> . J. MoI Biol. 1981, 147: 195-197
Sohn, 2014	Sohn, J., et al., <i>cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer</i> . Journal of Cancer, 2014. 5 (9): p. 745-753.
Suda, 2010	Suda, K., et al., <i>Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. 16 (22): p. 5489-5498.
Thompson, 2016	Thompson et al. <i>Rational design, biophysical and biological characterization of site-specific antibody-tubulysin conjugates with improved stability, efficacy and pharmacokinetics</i> . J Control Release. 2016, 236:100-16.
Tolcher, 2014	Tolcher, A., et al., <i>342 A phase 1/2 study evaluating the safety, pharmacokinetics and efficacy of ABT-414 in subjects with advanced solid tumors likely to over-express the epidermal growth factor receptor (EGFR)</i> . European Journal of Cancer, 2014. 50 : p. 111.
Tolcher, 2014	Tolcher, A.W., <i>Antibody drug conjugates: lessons from 20 years of clinical</i>

	<i>experience</i> . Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2016.
Troiani, 2016	Troiani, T., et al., <i>Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence</i> . ESMO open, 2016. 1 (5): p. e000088.
Trusolino, 2010	Trusolino, L., A. Bertotti, and P. Comoglio, <i>MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer</i> . Nature reviews.Molecular cell biology, 2010. 11 (12): p. 834.
Vainshtein, 2015	Vainshtein et al., <i>Quantitative measurement of the target-mediated internalization kinetics of biopharmaceuticals</i> , Pharm Res., 2015. 32 : 286–299.
Vaughan, 1996	Vaughan, et al., <i>Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library</i> , Nat Biotechnol., 1996. 14 : p. 309
Vecchione, 2011	Vecchione, L., et al., <i>EGFR-targeted therapy</i> . Special Issue - Gastroenterology, 2011. 317 (19): p. 2765-2771.
Vsiansky, 2018	Vsiansky, V., et al., <i>Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis</i> . Scientific Reports, 2018. 8 (1): p. 10370.
Wang, 2018	Wang, X. et al., <i>IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions</i> Protein Cell . 2018; 9 (1):63-73
Wang, 2017	Wang, J., et al., <i>ABBV-399, a c-Met Antibody-Drug Conjugate that Targets Both MET-Amplified and c-Met-Overexpressing Tumors, Irrespective of MET Pathway Dependence</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2017. 23 (4): p. 992-1000.
Wu, 2017	Wu, Y.-L., et al., <i>Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer?</i> Cancer Treatment Reviews, 2017. 61 : p. 70-81.
Xu, 2016	Xu, Y.P., et al., <i>C-Met as a Molecular Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Clinical Outcome</i> . Journal of Cancer, 2016. 7 (5): p. 587-594.
Yan, 2015	Yan, S., et al., <i>Prognostic significance of c-Met in breast cancer: a meta-analysis of 6010 cases</i> . Diagn Pathol, 2015. 10 : p. 62.
Zhang, 2016	Zhang, Y., Z. Du, and M. Zhang, <i>Biomarker development in MET-targeted</i>

	<i>therapy</i> . <i>Oncotarget</i> , 2016. 7 (24): p. 37370-37389.
Zhang, 2015	Zhang, Y.W., <i>Promise and challenges on the horizon of MET-targeted cancer therapeutics</i> . <i>World J Biol Chem</i> , 2015. 6 (2): p. 16-27.
Zucali, 2008	Zucali, P.A., et al., <i>Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors</i> . <i>Annals of Oncology</i> , 2008. 19 (9): p. 1605-1612.

For standard molecular biology techniques, см. в Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 изд. 2001 г., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

*Приложение с перечнем последовательностей*Последовательности CDR для клона RAA22 антитела к EGFR

HCDR1 – DNDFS (SEQ ID NO: 1)
 HCDR2 – AIVAVFRTETYAQKFQD (SEQ ID NO: 2)
 HCDR3 – RLMSAISGPGAPLLM (SEQ ID NO: 3)
 LCDR1 – TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 4)
 LCDR2 – DVSKRPS (SEQ ID NO: 5)
 LCDR3 – SSYTSSDTLEI (SEQ ID NO: 6)

Последовательности CDR для клона QD6 антитела к EGFR

HCDR1 – DNDFS (SEQ ID NO: 1)
 HCDR2 – AIVAVVRTETYAQKFQD (SEQ ID NO: 7)
 HCDR3 – RLMSAISGPGAPLLM (SEQ ID NO: 3)
 LCDR1 – TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 4)
 LCDR2 – DVSERPS (SEQ ID NO: 66)
 LCDR3 – FSYTSSDTLEI (SEQ ID NO: 67)

Последовательности FR для клонов RAA22 и QD6 антитела к EGFR

HFR1 – QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFS (SEQ ID NO: 8)
 HFR2 – WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 9)
 HFR3 – RVKITADISTRRTTYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 10)
 HFR4 – WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11)
 LFR1 – QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (SEQ ID NO: 12)
 LFR2 – WYQQHPGKAPKLMY (SEQ ID NO: 13)
 LFR3 – GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYC (SEQ ID NO: 14)
 LFR4 – FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 15)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) клона RAA22 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 16)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFS DNDFS WVRQAPGQGLEWMG AIVAVFRT
 ETYAQKFQDR VKITADISTRRTTYMELSSLRSED TAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
 GTLVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты области VH клона RAA22 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 17):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAA
 GGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTTAGCTGGGTCC
 GACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGTTCCGG

ACAGAGACATACGCCAGAAATTCCAGGACAGAGTGAAAATCACCGCCGACATCAG
 CACCAGAACCACCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGT
 ACTACTGCGCCAGACGGCTGATGTCTGCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCA
 TGTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

Аминокислотная последовательность области VH клона OD6 антитела к EGFR
 (SEQ ID NO: 18):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSDFNSWVRQAPGQGLEWMGAIIVAVVRT
 ETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
 GTLVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты области VH клона OD6 антитела к EGFR
 (SEQ ID NO: 19):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAA
 GGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTTAGCTGGGTCC
 GACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGGTCCGG
 ACAGAGACATACGCCAGAAATTCCAGGACAGAGTGAAAATCACCGCCGACATCAG
 CACCAGAACCACCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGT
 ACTACTGCGCCAGACGGCTGATGTCTGCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCA
 TGTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) клона
 RAA22 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 20):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSG
 VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL

Последовательность нуклеиновой кислоты области VL клона RAA22 антитела к EGFR
 (SEQ ID NO: 21):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACC
 ATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTAC
 CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACACTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCC
 CTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
 CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGCAGTTCATATACAAG
 CAGCGACACTCTCGAAATATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Аминокислотная последовательность области VL клона OD6 антитела к EGFR
 (SEQ ID NO: 22):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG
 VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL

Последовательность нуклеиновой кислоты области VL клона QD6 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 23):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACC
ATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTAC
CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAGTGAACGGCC
CTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGCTTCTCATATACAAG
CAGCGACACTCTCGAAATATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Последовательности CDR для клона B09-GL антитела к c-Met

HCDR1 – DYYIH (SEQ ID NO: 24)

HCDR2 – WMNPNSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 25)

HCDR3 – GQGYTHS (SEQ ID NO: 26)

LCDR1 – RASEGIYHWLA (SEQ ID NO: 27)

LCDR2 – KASSLAS (SEQ ID NO: 28)

LCDR3 – QQYSNYPPT (SEQ ID NO: 29)

Последовательности FR для клона B09-GL антитела к c-Met

HFR1 – QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (SEQ ID NO: 30)

HFR2 – WVRQATGQGLEWMG (SEQ ID NO: 31)

HFR3 – RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 32)

HFR4 – WGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 33)

LFR1 – DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 34)

LFR2 – WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 35)

LFR3 – GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (SEQ ID NO: 36)

LFR4 – FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 37)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) клона B09-GL антитела к c-Met (SEQ ID NO: 38):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
NTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGQGYTHSWGQGMVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты области VH клона B09-GL антитела к c-Met (SEQ ID NO: 39):

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCGTGAA
GGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCG
CCAGGCCACAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATGAACCCCAACAGCGGC
AACACCGGCTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACACCAG

CATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGT
 ACTACTGTGCCAGAGGCCAGGGCTACACCCACAGCTGGGGCCAGGGCACCATGGTC
 ACAGTGTCCAGC

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи (VL) клона B09-GL антитела к c-Met (SEQ ID NO: 40):

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты области VL клона B09-GL антитела к c-Met (SEQ ID NO: 41):

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCACCCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACAGAGT
 GACCATCACCTGTCGGGCCAGCGAGGGCATCTACCACTGGCTGGCCTGGTATCAGC
 AGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAGCCTGGCCAGC
 GGAGTCCCTAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATC
 AGCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAACTA
 CCCCCCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (CH) иммуноглобулина G1 человека (SEQ ID NO: 42):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутации по типу “выступ”, межцепочечных цистеиновых мутаций, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика и со вставкой цистеина (SEQ ID NO: 43):

Подчеркнуты следующие замены:

мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V); стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C) и вставка цистеина (C239i), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSYDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC

REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутации по типу “выступ”, межцепочечных цистеиновых мутаций, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика и без вставки цистеина (SEQ ID NO: 44):

Подчеркнуты следующие замены:

мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSYDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутаций по типу “впадина”, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика и со вставкой цистеина (SEQ ID NO: 45):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V); стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C) и вставка цистеина (C239i), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSP
REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутаций по типу “впадина”, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика и без вставки цистеина (SEQ ID NO: 46):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
EEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность константной области капта-цепи
иммуноглобулина человека дикого типа (SEQ ID NO: 47):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность константной области капта-цепи
иммуноглобулина человека, модифицированная с включением замен S121C и C214V
(SEQ ID NO: 48):

Подчеркнуты следующие замены:

S121C и C214V, где нумерация приведена согласно EU-индексу

RTVAAPSVFIFPPCDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV

Аминокислотная последовательность константной области лямбда-цепи
иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 49):

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона B09-GL антитела к c-Met со
вставкой цистеина (SEQ ID NO: 50):

Подчеркнуты следующие замены:

мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и
C219V); стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C) и вставка цистеина (C239i), где
нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
NTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGMVT
VSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона B09-GL антитела к c-Met без вставки цистеина (SEQ ID NO: 51):

Подчеркнуты следующие замены:

мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
NTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGMVT
VSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Аминокислотная последовательность легкой цепи клона B09-GL антитела к c-Met (SEQ ID NO: 52):

Подчеркнуты следующие замены:

S121C и C214V, где нумерация приведена согласно EU-индексу

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPC
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона OD6 антитела к EGFR со вставкой цистеина (SEQ ID NO: 53):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V); стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C) и вставка цистеина (C239i), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRT
ETYAQKFQDRVKITADISTRITTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP

QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона OD6 антитела к EGFR без вставки цистеина (SEQ ID NO: 54):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRT
ETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи клона OD6 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 55):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG
VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPS
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYA
ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона RAA22 антитела к EGFR со вставкой цистеина (SEQ ID NO: 56):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V); стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C) и вставка цистеина (C239i), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRT
ETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи клона RAA22 антитела к EGFR без вставки цистеина (SEQ ID NO: 57):

Подчеркнуты следующие замены:

мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRT
 ETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи клона RAA22 антитела к EGFR (SEQ ID NO: 58):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSG
 VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPS
 VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA
 ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи к EGFR в антителе “EGFR-cMET TM” (SEQ ID NO: 59):

Подчеркнуты следующие замены:

тройная мутация (TM; L234F, L235E и P331S); мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V); стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRT
 ETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPP
 CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи к c-Met в антителе “EGFR-cMET TM” (SEQ ID NO: 60):

Подчеркнуты следующие замены:

тройная мутация (TM; L234F, L235E и P331S); мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
NTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVT
VSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи к EGFR в антителе “EGFR-cMET TM” (SEQ ID NO: 61):

Подчеркнуты следующие замены:

S121C и C214V, где нумерация приведена согласно EU-индексу

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSG
VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPS
VTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYA
ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEYS

Аминокислотная последовательность легкой цепи к c-Met в антителе “EGFR-cMET TM” (SEQ ID NO: 62):

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутаций по типу “выступ”, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика, без вставки цистеина и с TM (SEQ ID NO: 63):

Подчеркнуты следующие замены:

тройная мутация (TM; L234F, L235E и P331S); мутация по типу “выступ” (T366W); межцепочечные цистеиновые мутации (F126C и C219V); стабилизирующая цистеиновая мутация (S354C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность области CH иммуноглобулина G1 человека, модифицированная с включением мутаций по типу “впадина”, цистеина для образования стабилизирующего дисульфидного мостика, без вставки цистеина и с TM (SEQ ID NO: 64):

Подчеркнуты следующие замены:

тройная мутация (TM; L234F, L235E и P331S); мутации по типу “впадина” (T366S, L368A и Y407V) и стабилизирующая цистеиновая мутация (Y349C), где нумерация остатков приведена согласно EU-индексу.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность константной области лямбда-цепи иммуноглобулина человека, модифицированная с включением замен S121C и C214V (SEQ ID NO: 65):

GQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена EGFR человека (SEQ ID NO: 68):

LEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRES DCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYE

MEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRG
 DSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA
 VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK
 ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCH
 PECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHV
 CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена EGFR яванского макака (SEQ ID NO: 69):

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQ
 EVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQE
 ILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNHGSCQKCDPSCPNGSCWG
 AGEENCQKLTKIICAQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATC
 KDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYE
 MEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFR
 GDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSL
 AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSC
 KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNILEGEPREFVENSECIQC
 HPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGH
 VCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPS

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена c-Met человека (SEQ ID NO: 70):

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAE
 YKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWVDNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTC
 QRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTIN
 SSYFPDHPHLSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLT
 VQRETLD AQT FHTRIIRFCSINSGLHSEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSK
 PGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIVNDFFNKIVNKNNV
 RCLQHFYGPNEHCNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSIS
 TFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLDSDHPVSPEVIVEHTLNQNGYTL
 VITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLP
 AIYKVFNPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNKNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLK
 CTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLTTLTGNLYLN
 SGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYREDPIVYE
 IHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQ
 QLNQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDP

EAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQP
DQNFT

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена с-Met яванского макака
(SEQ ID NO: 71):

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAE
YKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWVDNINMALVVDYTYDDQLISCGSVNRGTC
QRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPNQCPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTIN
SSYFPHHPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNNFIYFLTV
QRETLNAQTFHTRIIRFCSLNSGLHSEMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSK
PGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNNV
RCLQHFYGPNEHCNRTLLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSIS
TFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSEVPEVIVEHPLNQNGYTL
VVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECPSGTWTQQICLP
AIYKVFPTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNKNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMNTLK
CTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPIITSISPKYGPMAGGTLTTLTGNYLNS
GNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFS YREDPIVYEI
HPTKSFISGGSTITGVGKNLHSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQQ
LNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDPE
AVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQP
DQNFT

Формула изобретения

1. Молекула антитела, содержащая:
первый антигенсвязывающий домен, который связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); и
второй антигенсвязывающий домен, который связывает с-Met,
где первый антигенсвязывающий домен содержит:
 - (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):
HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,
HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,
HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,
или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и
 - (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:
LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,
LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,
LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6,
или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.
2. Молекула антитела по п. 1, где первый антигенсвязывающий домен содержит:
 - (i) область VH, содержащую следующие CDR:
HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,
HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,
HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
и
 - (ii) область VL, содержащую следующие CDR:
LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,
LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,
LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.
3. Молекула антитела по п. 1 или п. 2, где первый антигенсвязывающий домен связывается с EGFR человека с аффинностью, характеризующейся K_d , которая:
 - (i) равняется или превышает 10 нМ;
 - (ii) равняется или превышает 30 нМ или
 - (iii) равняется или превышает 40 нМ.

4. Молекула антитела по п. 1 или п. 2, где первый антигенсвязывающий домен связывается с EGFR человека с аффинностью, характеризующейся K_d , которая:

- (i) находится в диапазоне от 10 до 100 нМ;
- (ii) находится в диапазоне от 20 до 80 нМ;
- (iii) находится в диапазоне от 30 до 75 нМ или
- (iv) находится в диапазоне от 35 до 50 нМ.

5. Молекула антитела по любому из пп. 1-4, где первый антигенсвязывающий домен связывается с EGFR человека с аффинностью, которая ниже, чем аффинность антигенсвязывающего домена, содержащего последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи молекулы антитела QD6, последовательности которых представлены под SEQ ID NO: 18 и 22 соответственно.

6. Молекула антитела по любому из предыдущих пунктов, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16; и

область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

7. Молекула антитела по любому из предыдущих пунктов, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

- (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и

- (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

8. Молекула антитела по п. 7, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

(i) область VH, содержащую следующие CDR:

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26;

и

(ii) область VL, содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

9. Молекула антитела по п. 7 или п. 8, где второй антигенсвязывающий домен связывается с cMet с аффинностью, характеризующейся K_d , которая:

(i) ниже 10 нМ или

(ii) ниже 5 нМ.

10. Молекула антитела по любому из пп. 3-5 и п. 9, где аффинность измерена методом поверхностного плазмонного резонанса.

11. Молекула антитела по любому из пп. 7-10, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

область VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 38; и

область VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40.

12. Молекула антитела по любому из предыдущих пунктов, где молекула антитела содержит:

первую тяжелую цепь, где первая тяжелая цепь содержит область VH первого антигенсвязывающего домена и первую константную область тяжелой цепи (CH) или ее фрагмент;

первую легкую цепь, где первая легкая цепь содержит область VL первого антигенсвязывающего домена и первую константную область легкой цепи (CL) или ее фрагмент;

вторую тяжелую цепь, где вторая тяжелая цепь содержит область VH второго антигенсвязывающего домена и вторую константную область тяжелой цепи (CH) или ее фрагмент; и

вторую легкую цепь, где вторая легкая цепь содержит область VL второго антигенсвязывающего домена и вторую константную область легкой цепи (CL) или ее фрагмент.

13. Молекула антитела по п. 12, где первая и вторая области CH содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 42.

14. Молекула антитела по п. 12 или п. 13, где первая и вторая тяжелые цепи образуют гетеродимер, где необязательно одна из первой и второй тяжелых цепей содержит остаток цистеина (C) в положении 354 и остаток триптофана (W) в положении 366, а другая тяжелая цепь содержит остаток цистеина (C) в положении 349, остаток валина (V) в положении 407, серин (S) в положении 366 и аланин (A) в положении 368, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

15. Молекула антитела по любому из пп. 12-14, где молекула антитела содержит:

(a) модифицированную область CH, где модифицированная область CH содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин; и

(b) модифицированную соответствующую область CL, где модифицированная CL содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин,

где либо:

(i) первая тяжелая цепь содержит модифицированную область CH, а первая легкая цепь содержит модифицированную соответствующую область CL; либо

(ii) вторая тяжелая цепь содержит модифицированную область CH, а вторая легкая цепь содержит модифицированную соответствующую область CL; и

где введенный заменой цистеин модифицированной области CH и введенный заменой цистеин модифицированной соответствующей легкой цепи могут образовывать дисульфидную связь.

16. Молекула антитела по п. 15, где модифицированная область СН содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин в положении 126; а модифицированная соответствующая область СL содержит замену нативной отличной от цистеина аминокислоты на аминокислоту цистеин в положении 121, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

17. Молекула антитела по любому из пп. 12-16, где первая и/или вторая области СН содержат мутацию, обеспечивающую уменьшение или устранение связывания молекулы антитела с одним из нескольких Fcγ-рецепторов.

18. Молекула антитела по любому из пп. 12-17, где первая и/или вторая области СН содержат фенилаланин в положении 234, глутаминовую кислоту в положении 235 и серин в положении 331, где нумерация константной области соответствует EU-индексу.

19. Молекула антитела по любому из пп. 12-18, где первая область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 45, 46 или 63, и вторая область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 43, 44 или 64, и где необязательно первая область СL содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 49 или 65, и вторая область СL содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 47 или 48.

20. Молекула антитела по п. 19, где первая область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 63, и вторая область СН содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 64, и где первая область СL содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 65, и вторая область СL содержит аминокислотную

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 47.

21. Молекула антитела по п. 19, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 56, 57 или 59, и вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 50, 51 или 60, и где необязательно первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 58 или 61, и вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 52 или 62.

22. Молекула антитела по п. 20, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 59, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60, первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61, а вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62.

23. Молекула антитела по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) первый антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, связывается с EGFR яванского макака;

(ii) первый антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, связывается с EGFR мыши;

(iii) второй антигенсвязывающий домен, который связывается с c-Met, связывается с c-Met яванского макака;

(iv) первый антигенсвязывающий домен является специфическим для EGFR;

(v) второй антигенсвязывающий домен является специфическим для c-Met;

(vi) молекула антитела способна одновременно взаимодействовать с EGFR и c-Met;

(vii) молекула антитела способна интернализироваться в клетку;

(viii) молекула антитела обладает цитотоксической активностью при измерении в анализе жизнеспособности клеток *in vitro*; и/или

(ix) молекула антитела способна блокировать лиганд-зависимую передачу сигнала EGFR и/или c-Met.

24. Молекула антитела, содержащая:

первый антигенсвязывающий домен, который связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR);

где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и

(ii) переменную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4,

LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или нескольких из LCDR1, LCDR2 или LCDR3 заменены другой аминокислотой.

25. Молекула антитела, содержащая:

первый антигенсвязывающий домен, который связывает c-MET,

где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR):

HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25,

HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой; и

(ii) переменную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR:

LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

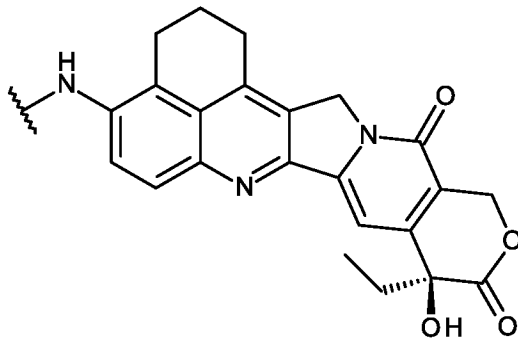
LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28,

LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29, или ее вариант, в котором одна, или две, или три в одной или нескольких из HCDR1, HCDR2 или HCDR3 заменены другой аминокислотой.

26. Конъюгат, содержащий молекулу антитела по любому из предыдущих пунктов, конъюгированную с лекарственным средством.

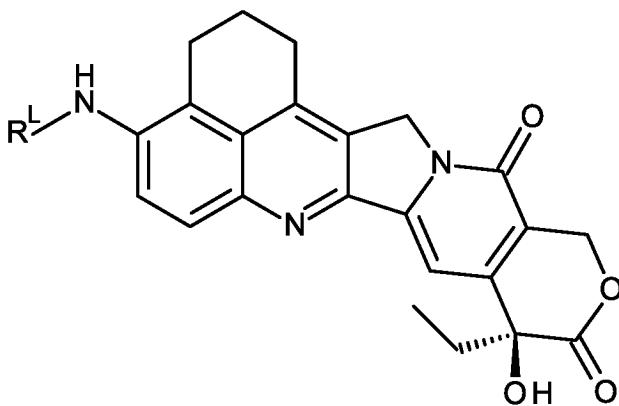
27. Конъюгат по п. 26, где лекарственное средство предусматривает цитотоксин, радиоактивный изотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, средство для RNAi, микроРНК, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптозное средство, пептид, липид, углевод, хелатообразующее средство или их комбинации.

28. Конъюгат по п. 26 или п. 27, где лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, имеющий формулу A*:



A*

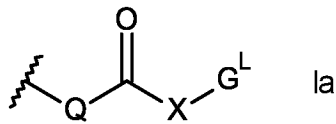
29. Конъюгат по п. 28, где ингибитор топоизомеразы I имеет формулу I:



I

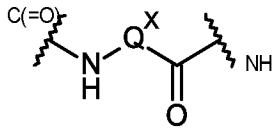
или его соль или сольваты, где R^L представляет собой линкер для присоединения к молекуле антитела, где необязательно указанный линкер выбран из:

(ia):



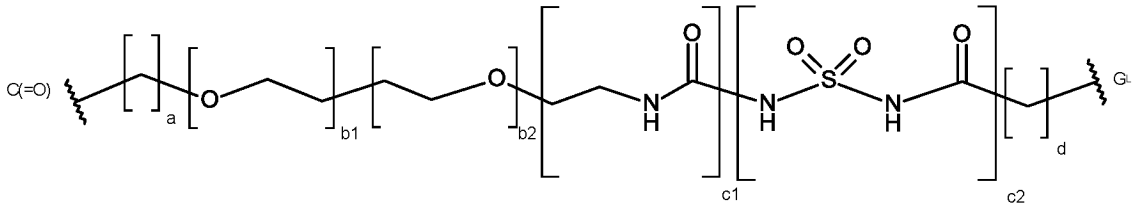
где

Q представляет собой:



, где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

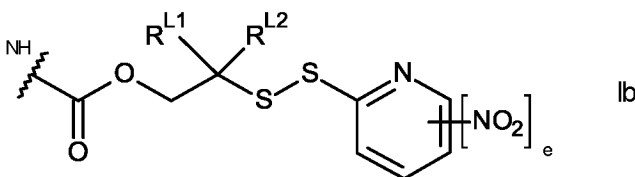
X представляет собой:



где a составляет 0-5, b1 составляет 0-16, b2 составляет 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d составляет 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0 (т. е. только один из b1 и b2 может не быть 0), и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0 (т. е. только один из c1 и c2 может не быть 0);

G^L представляет собой линкер для присоединения к молекуле антитела; или

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e составляет 0 или 1.

30. Конъюгат по любому из пп. 26-29, имеющий формулу IV:



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват,

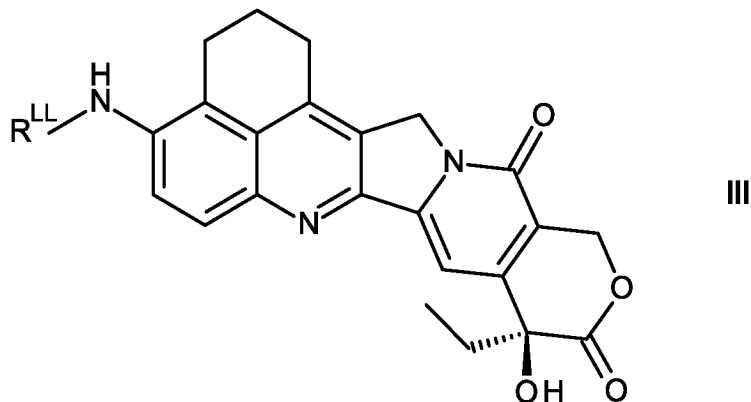
где

L представляет собой молекулу антитела;

D^L представляет собой лекарственное средство с линкером; и
 r представляет собой целое число от 1 до 20.

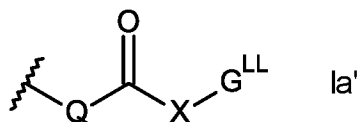
31. Конъюгат по п. 30, где r представляет собой диапазон, выбранный из 2-8, 3-7, 4-7 или 5-7.

32. Конъюгат по п. 30 или п. 31, где D^L представляет собой ингибитор топоизомеразы I с линкером, характеризующийся формулой III:



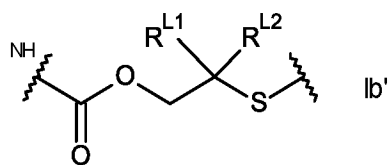
R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к молекуле антитела, где линкер выбран из:

(Ia'):



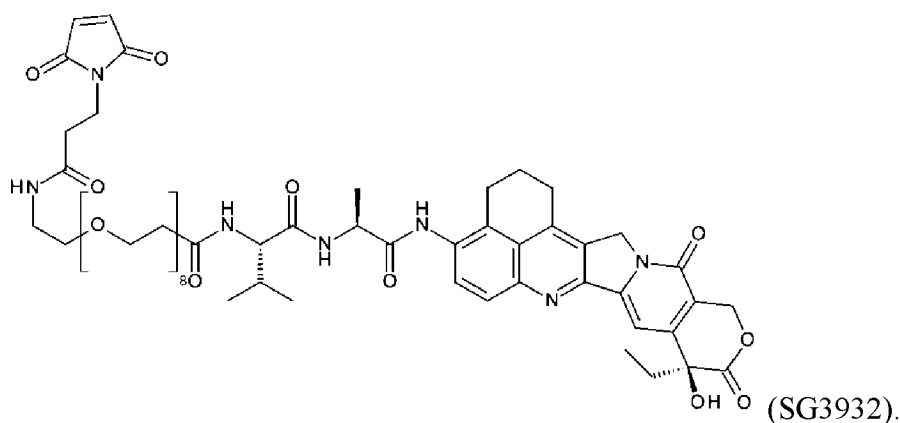
где Q и X являются такими, как определено в п. 29, а G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к молекуле антитела; и

(Ib'):



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в п. 29.

33. Конъюгат по любому из пп. 26-32, где молекула антитела конъюгирована с ингибитором топоизомеразы I, имеющим следующую формулу:



34. Конъюгат по любому из пп. 26-33, где:

- (i) конъюгат способен одновременно взаимодействовать с EGFR и с-Met;
- (ii) конъюгат способен интернализироваться в клетку;
- (iii) конъюгат обладает цитотоксической активностью при измерении в анализе жизнеспособности клеток *in vitro*; и/или
- (iv) конъюгат способен ингибировать развитие или прогрессирование рака при измерении на модели *in vivo*.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу антитела по любому из пп. 1-25 или конъюгат по любому из пп. 26-34 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Молекула антитела по любому из пп. 1-25, конъюгат по любому из пп. 26-34 или фармацевтическая композиция по п. 35 для применения в способе лечения организма человека или животного.

37. Молекула антитела по любому из пп. 1-25, конъюгат по любому из пп. 26-34 или фармацевтическая композиция по п. 35 для применения в способе лечения рака.

38. Способ лечения рака, включающий введение молекулы антитела по любому из пп. 1-25, конъюгата по любому из пп. 26-34 или фармацевтической композиции по п. 35 нуждающемуся в этом субъекту.

39. Применение молекулы антитела по любому из пп. 1-25, конъюгата по любому из пп. 26-34 или фармацевтической композиции по п. 35 при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

40. Молекула антитела, конъюгат или фармацевтическая композиция для применения по п. 37, способ лечения по п. 38 или применение по п. 39, где рак представляет собой рак легкого (такой как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рак поджелудочной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN или SQHN), рак яичника или глиобластому.

41. Молекула антитела, конъюгат или фармацевтическая композиция для применения по п. 37, способ лечения по п. 38 или применение по п. 39, где рак представляет собой рак легкого (такой как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)) или плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN или SQHN).

42. Нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот, необязательно выделенные, кодирующие молекулу антитела по любому из пп. 1-25.

43. Вектор экспрессии или совокупность векторов экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот по п. 42.

44. Рекombинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот по п. 42 или вектор экспрессии или совокупность векторов экспрессии по п. 43.

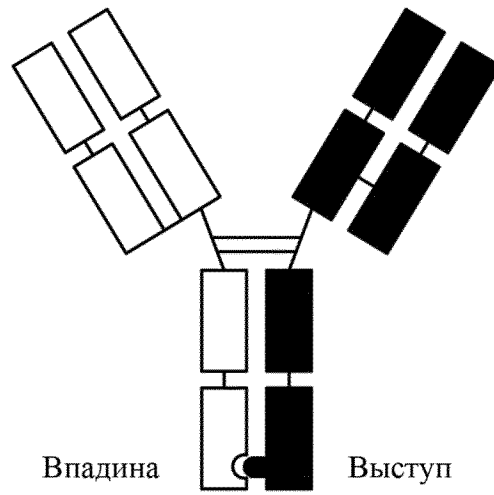
45. Способ получения молекулы антитела по любому из пп. 1-25, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по п. 44 в условиях, подходящих для продуцирования молекулы антитела.

46. Способ по п. 45, дополнительно включающий выделение и/или очистку молекулы антитела.

Фиг. 1А

Антитело RAA22
к EGFR

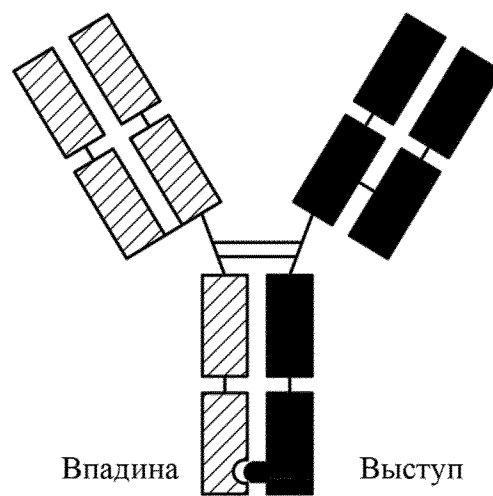
Антитело B09-57
к cMET



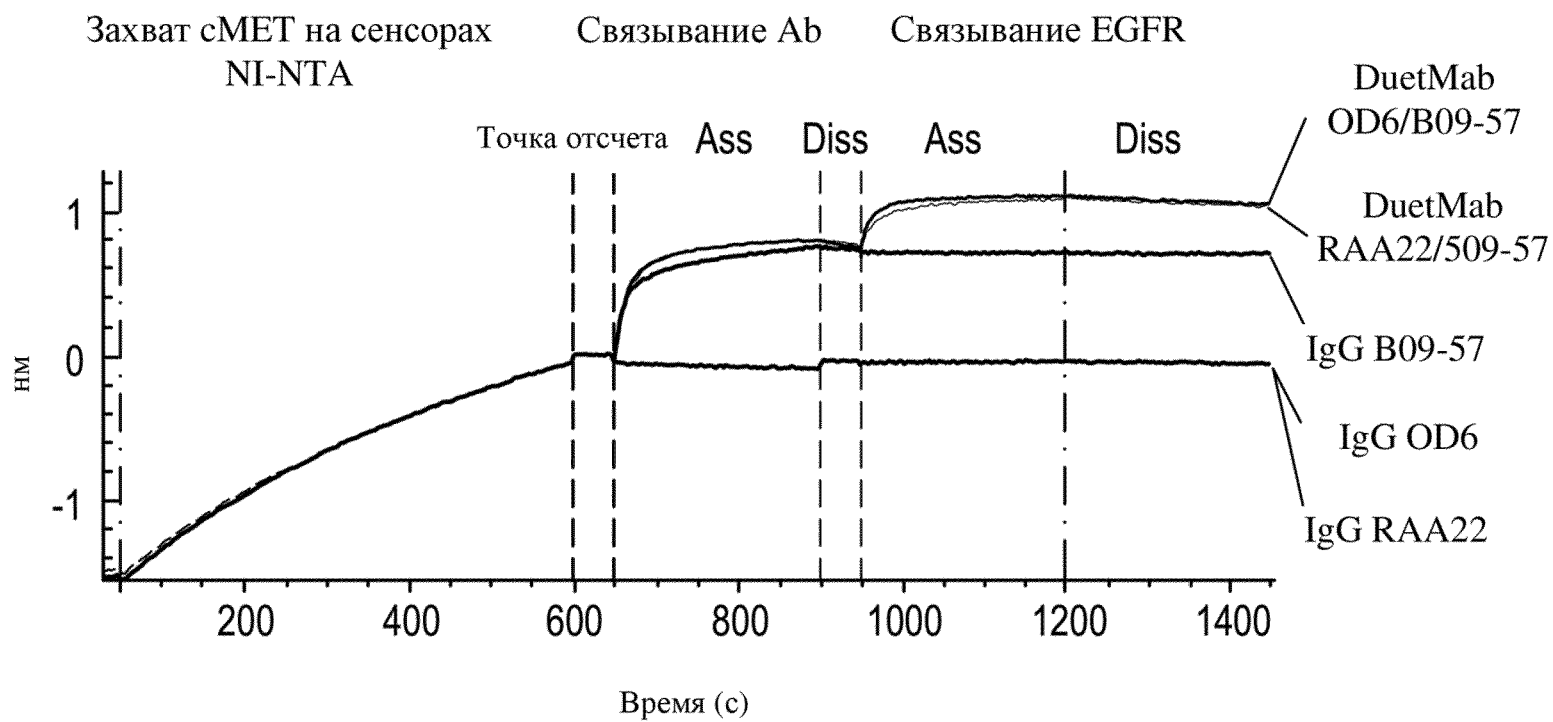
Фиг. 1В

Антитело OD6
к EGFR

Антитело B09-57
к cMET

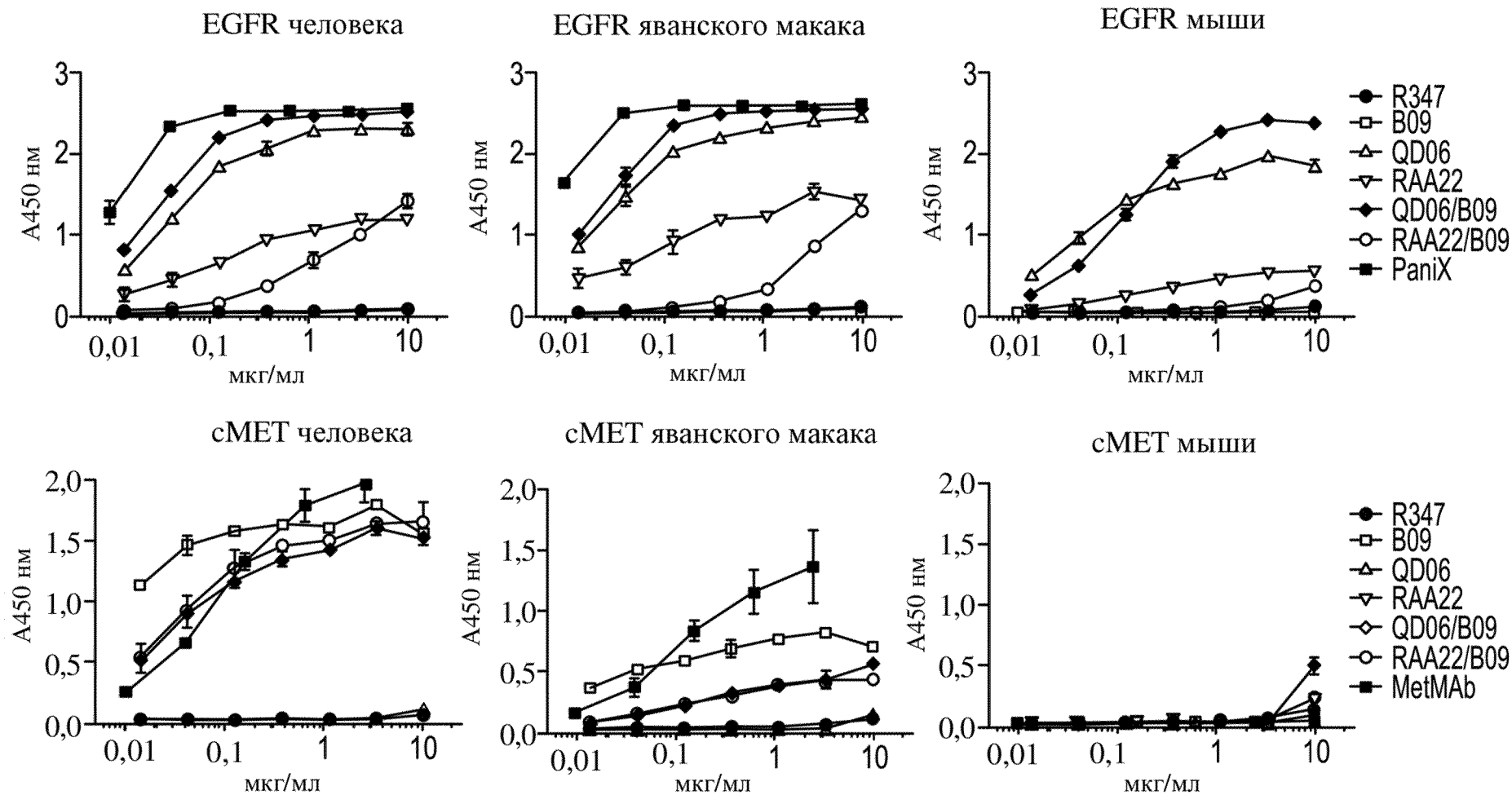


Фиг. 2



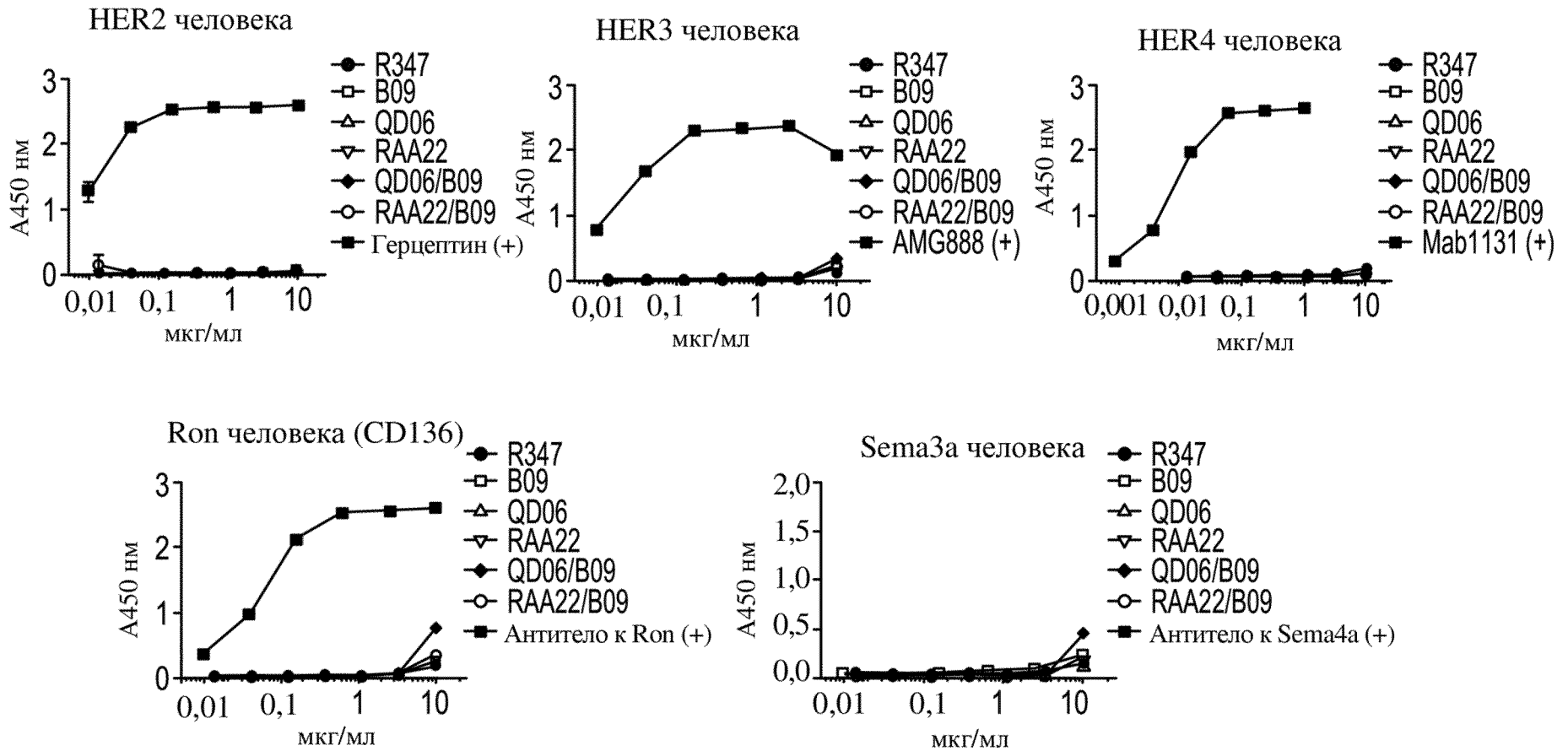
Фиг. 3А

Видовая специфичность EGFR и cMET



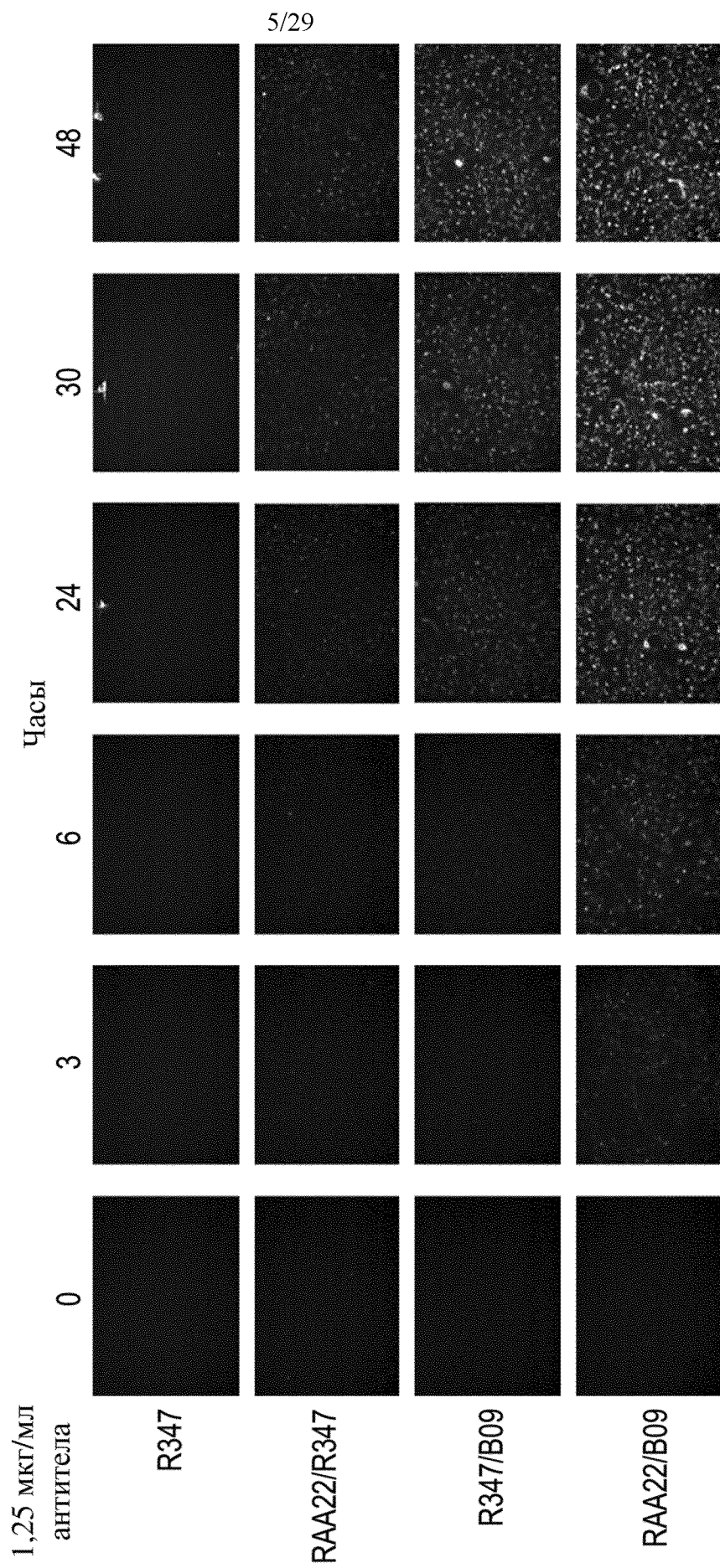
Фиг. 3В

Семейная специфичность EGFR и cMET



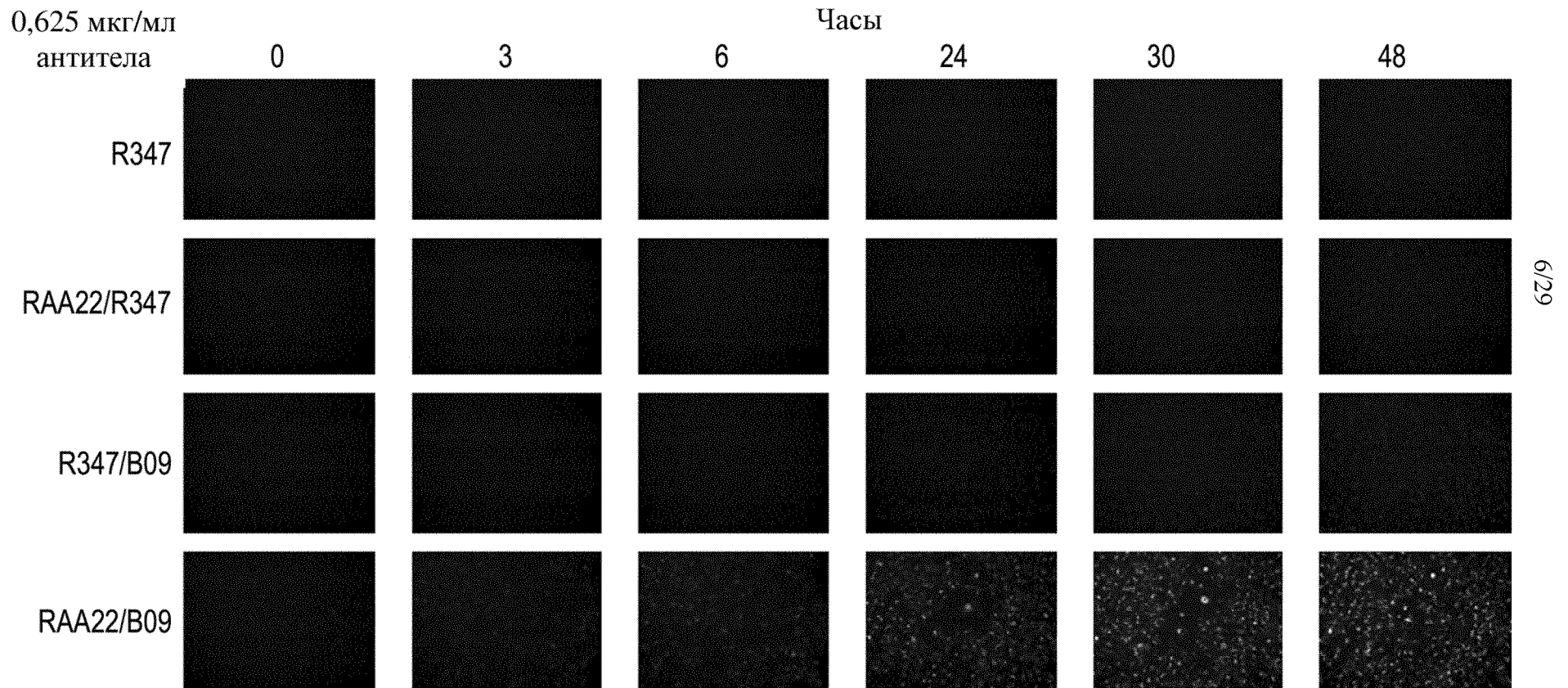
Фиг. 4

Интернализация mAb, измеренная по поглощению красителя rNAb

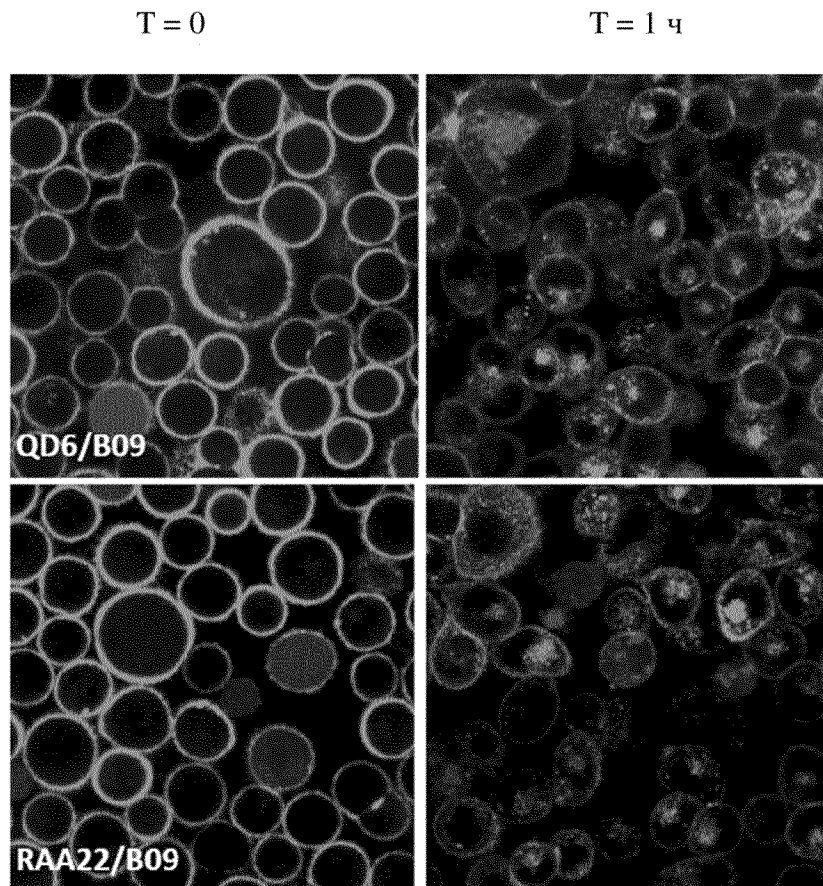


Фиг. 5

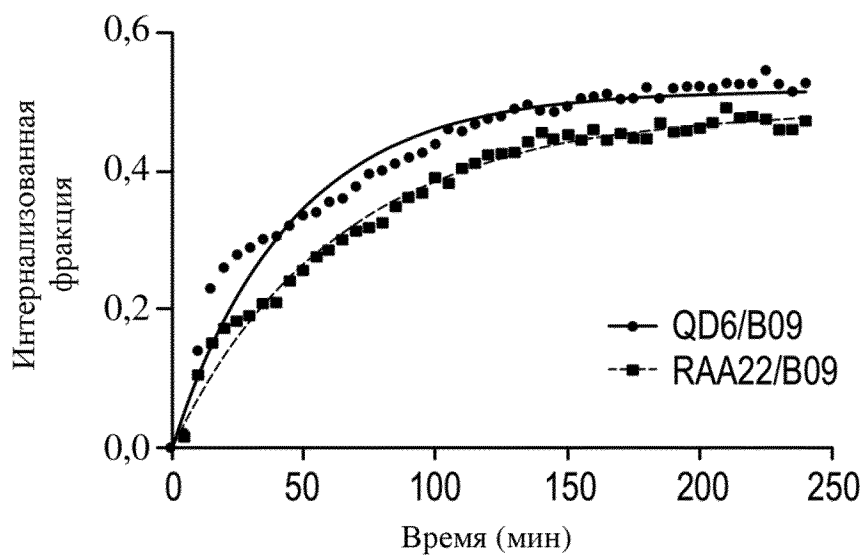
Интернализация mAb, измеренная по поглощению красителя рНАб



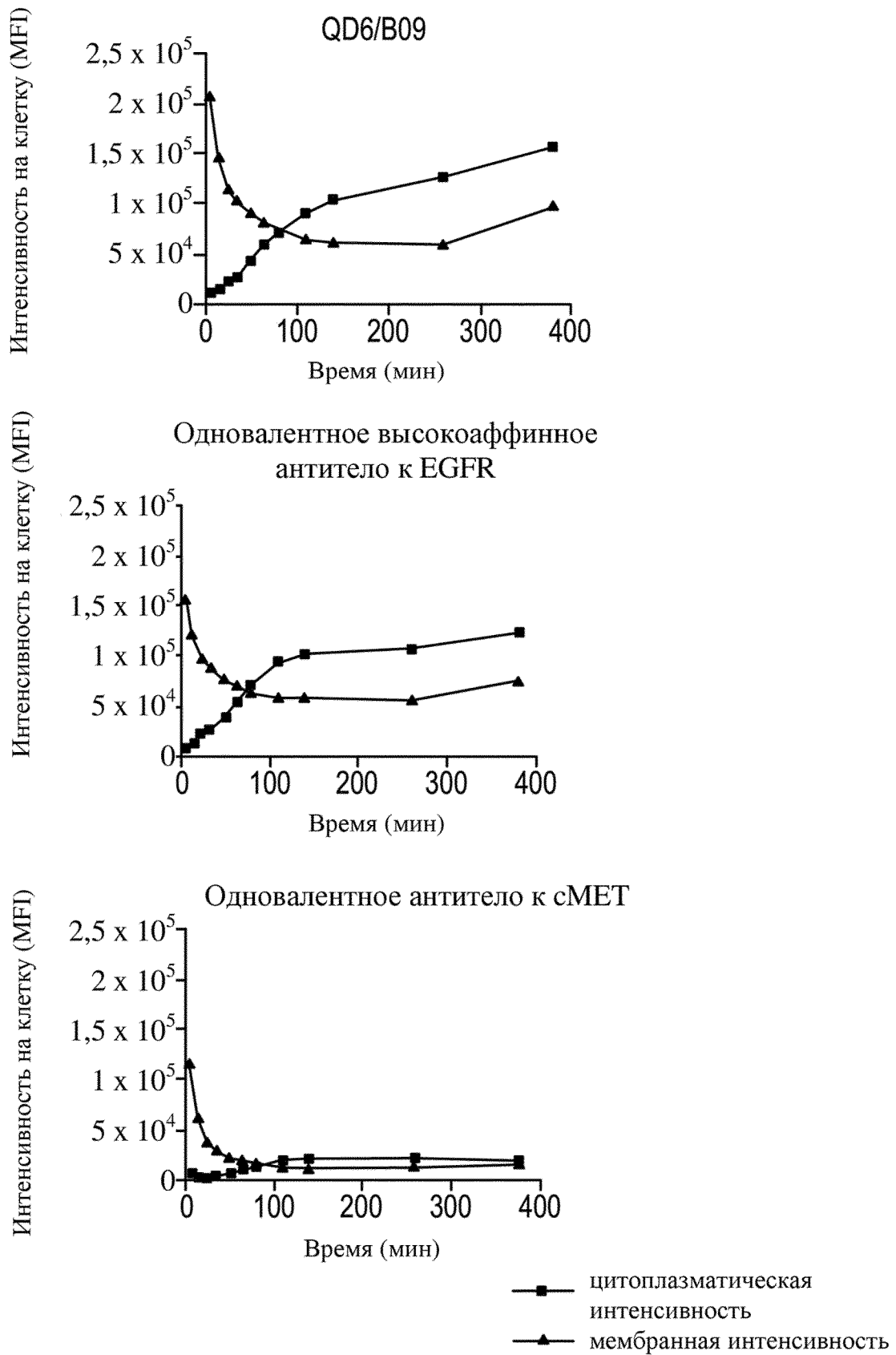
Фиг. 6А



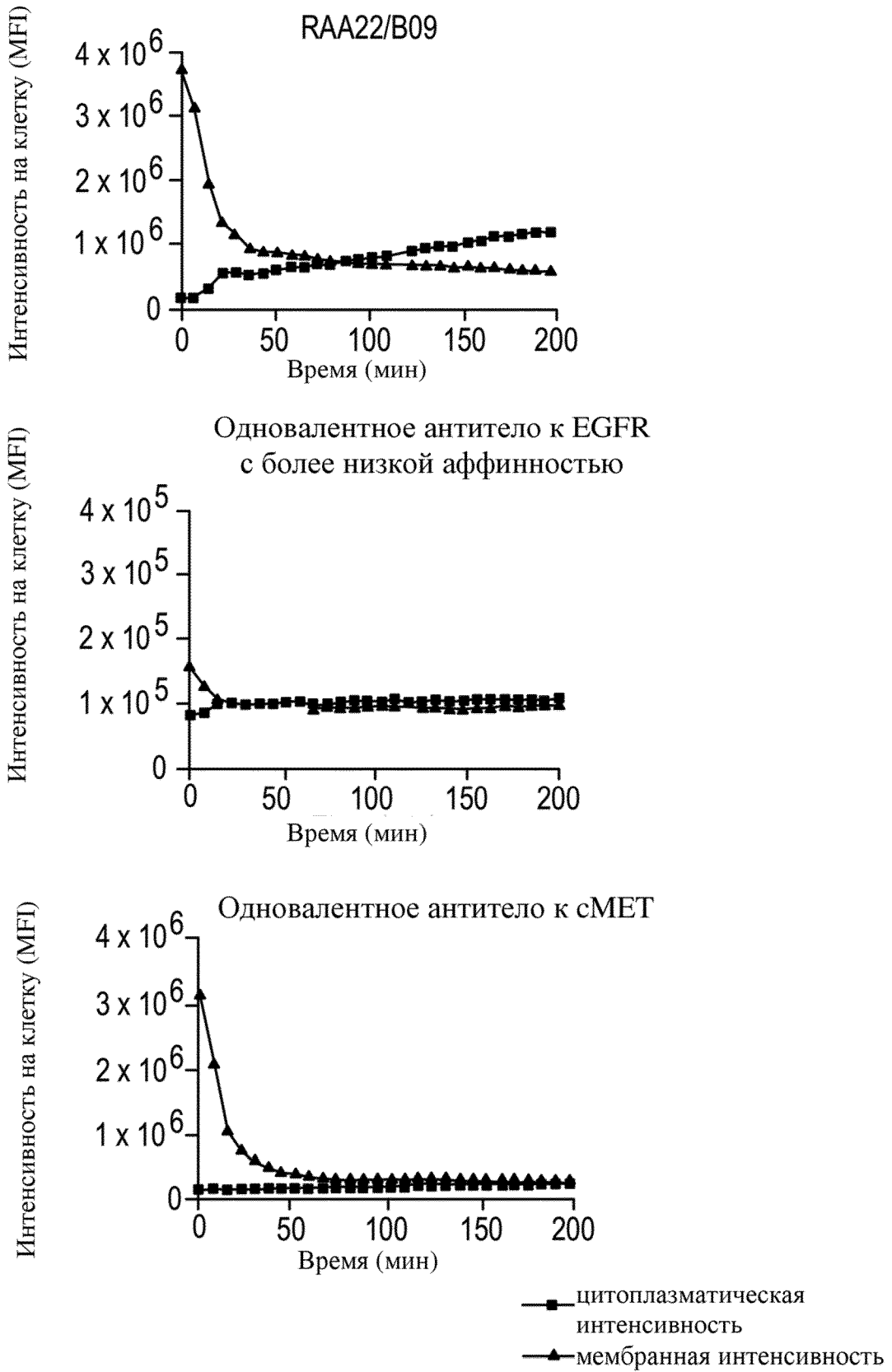
Фиг. 6В



Фиг. 7А

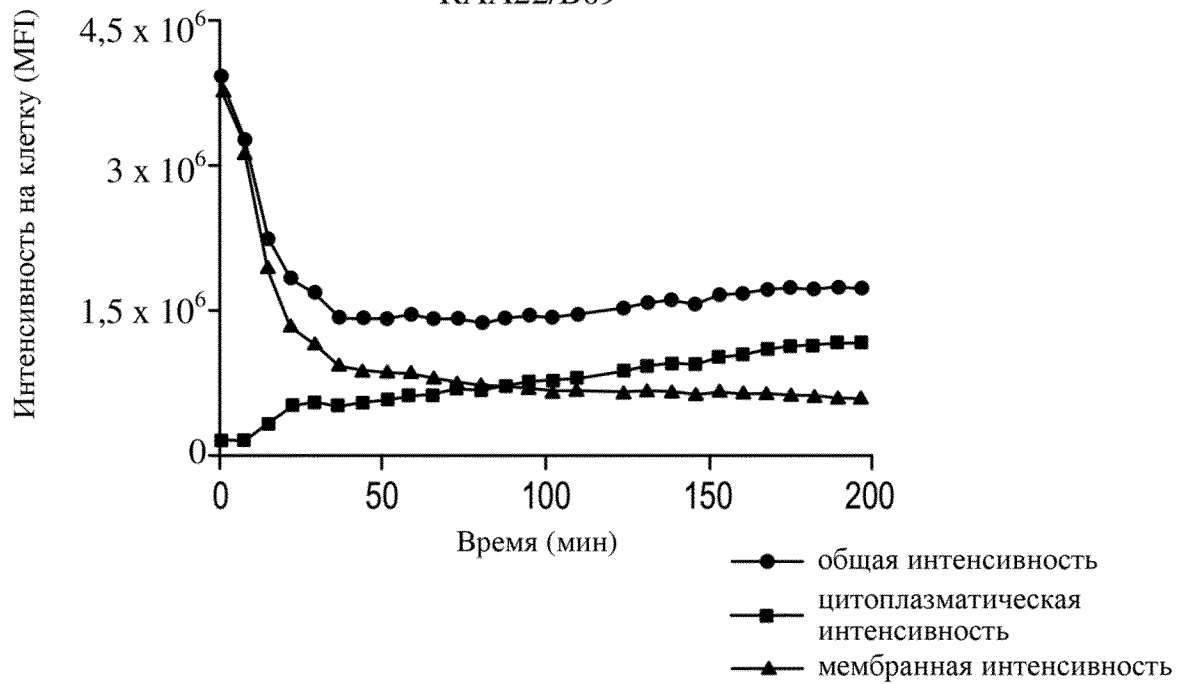


Фиг. 7В



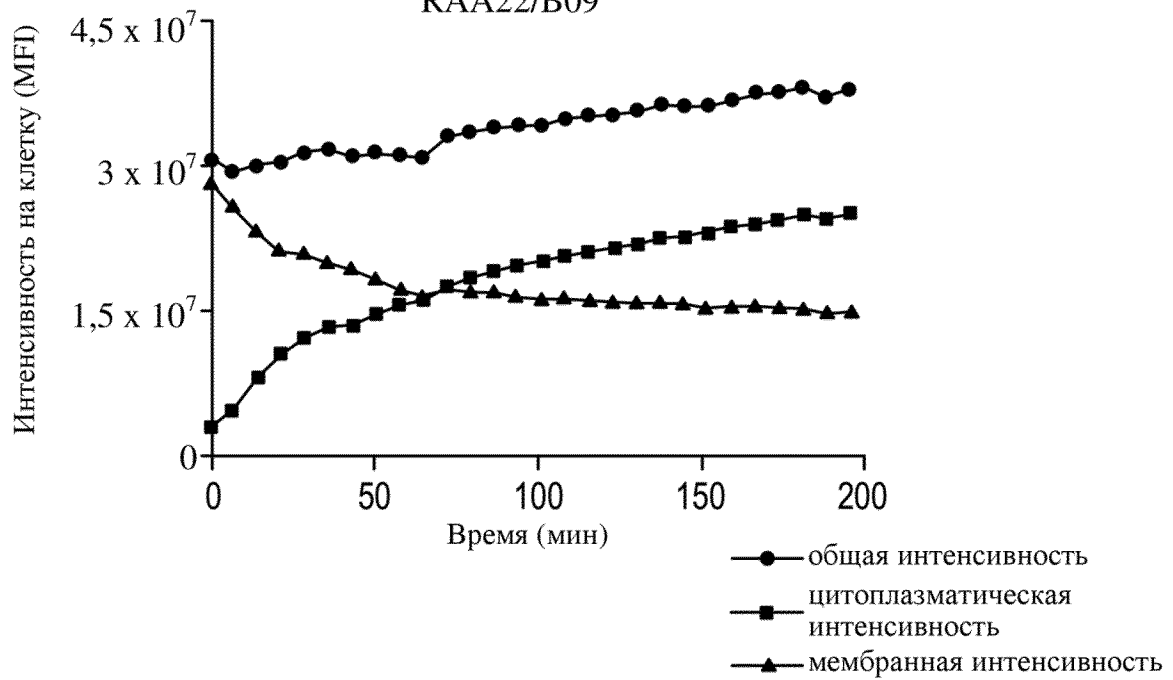
Фиг. 8А

Клетки H1975
RAA22/B09



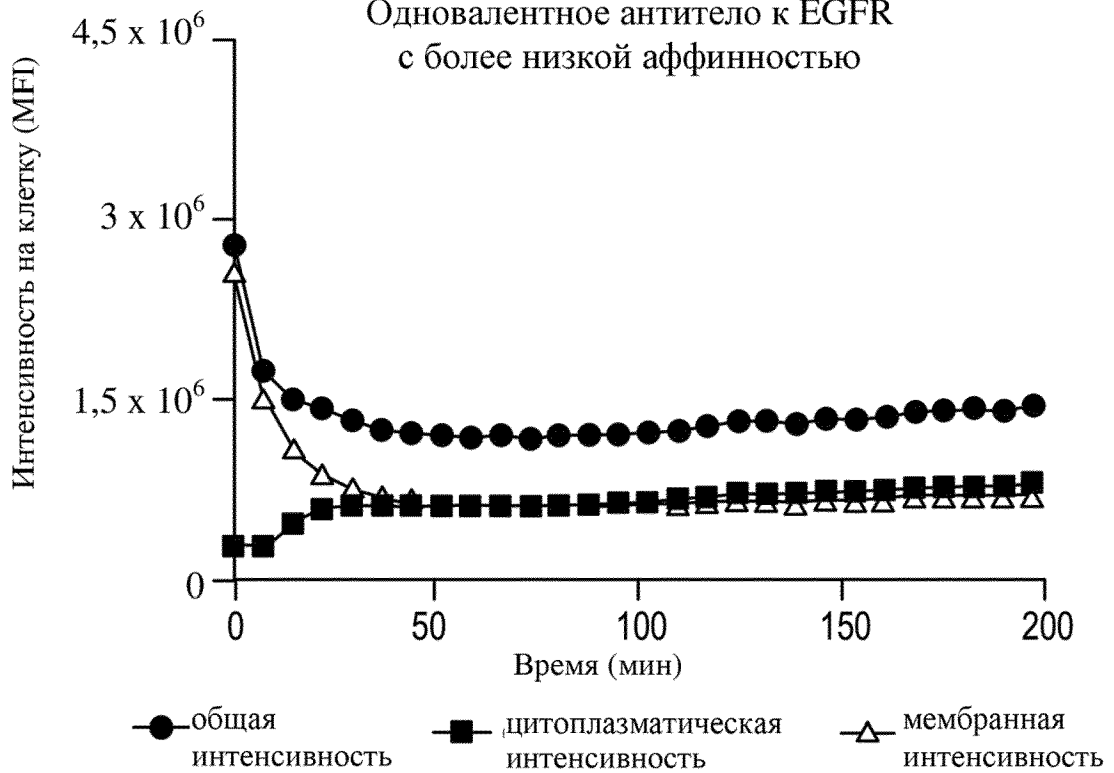
Фиг. 8В

Клетки HCC827
RAA22/B09



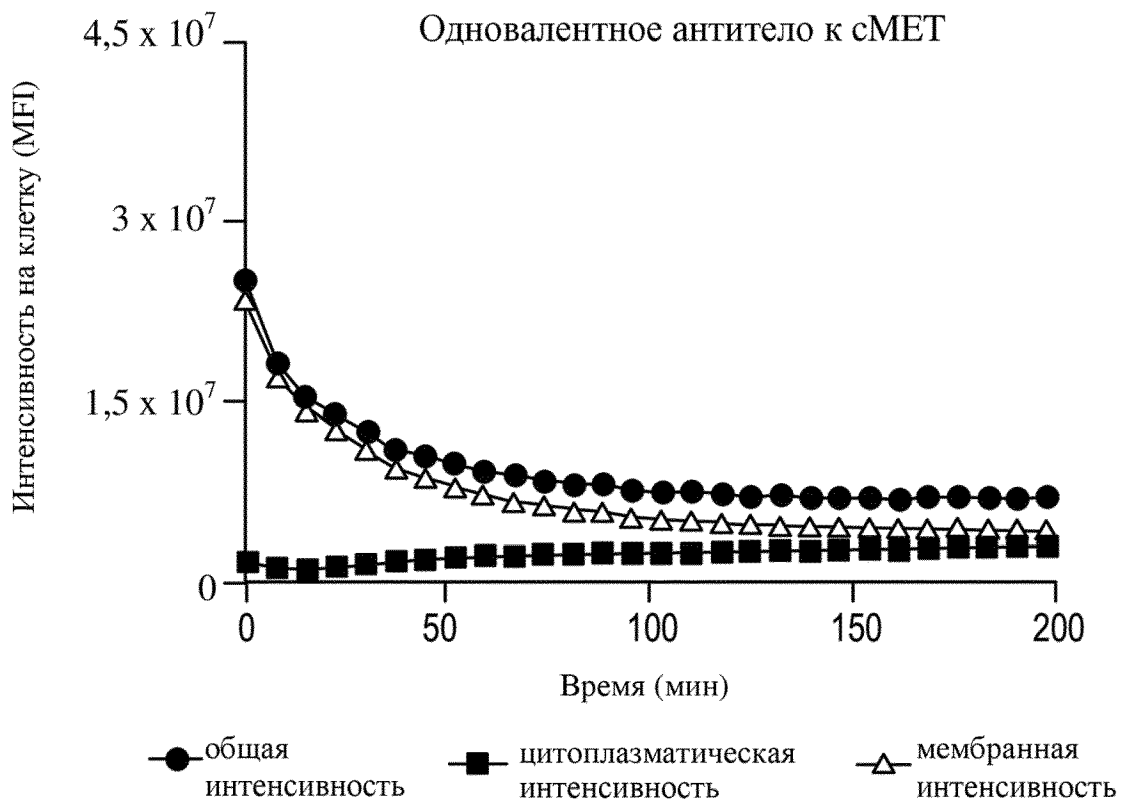
Фиг. 9А

Клетки H1975

Одновалентное антитело к EGFR
с более низкой аффинностью**Фиг. 9В**

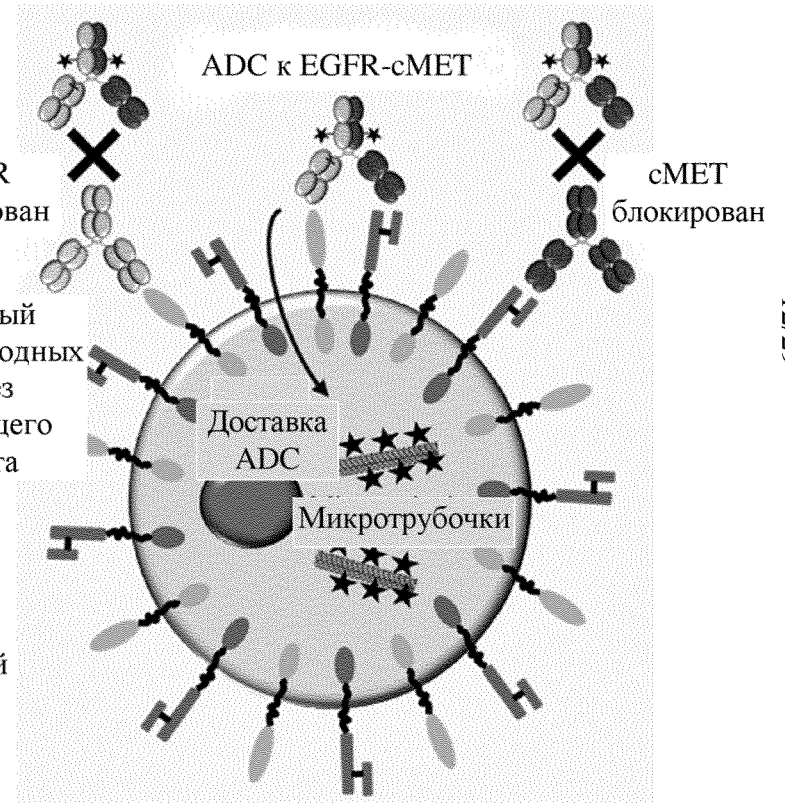
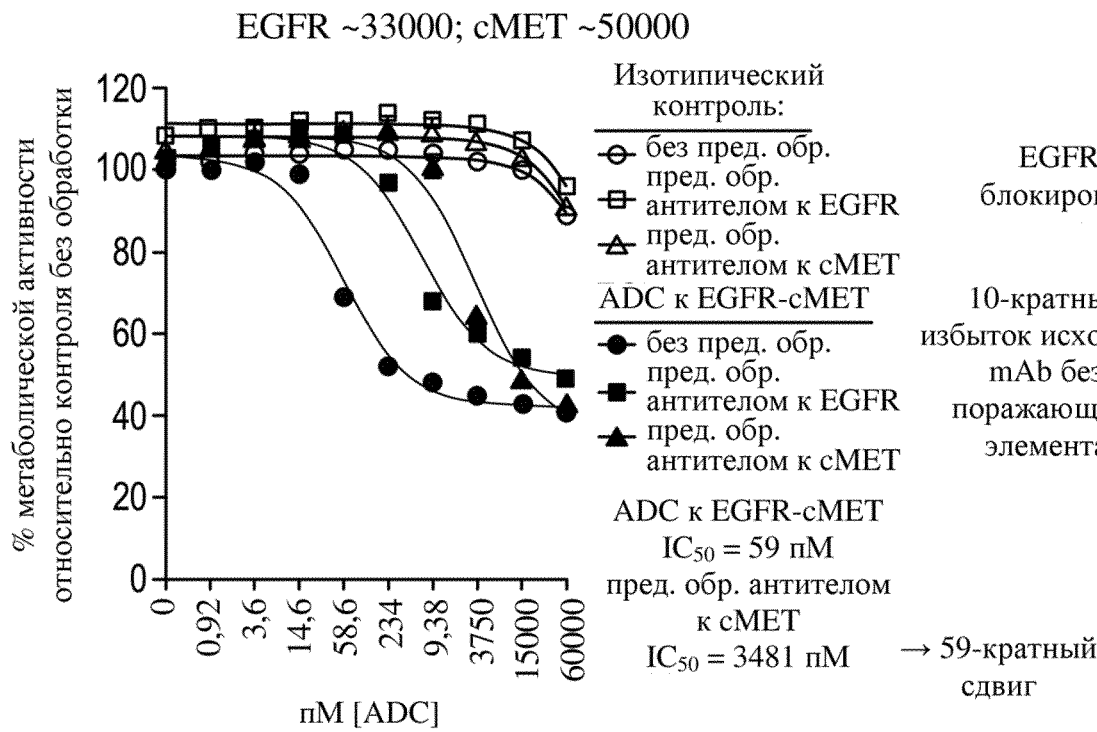
Клетки HCC827

Одновалентное антитело к cMET



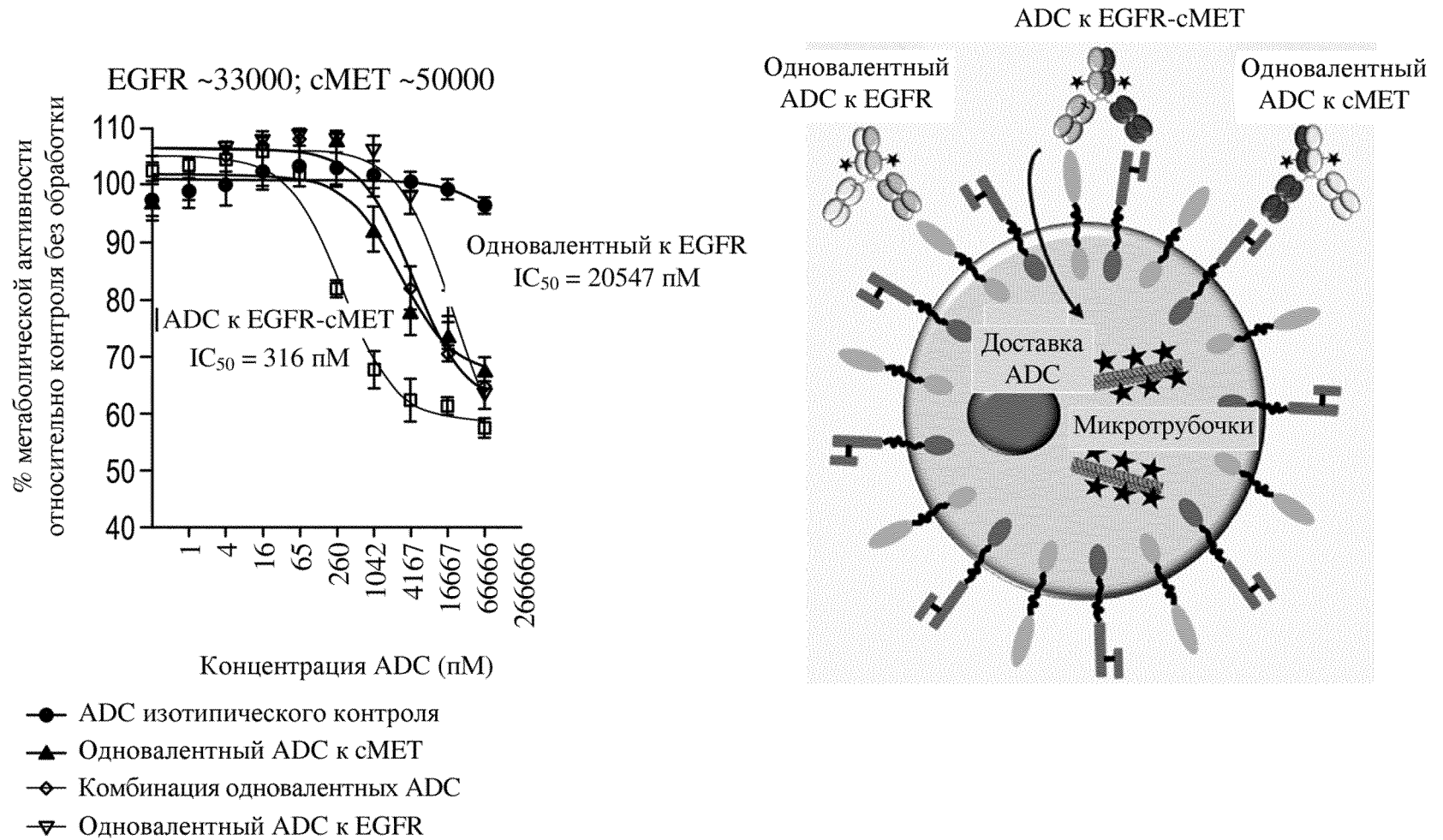
Фиг. 10

Блокирование EGFR или cMET снижает активность биспецифического ADC в условиях *in vitro*

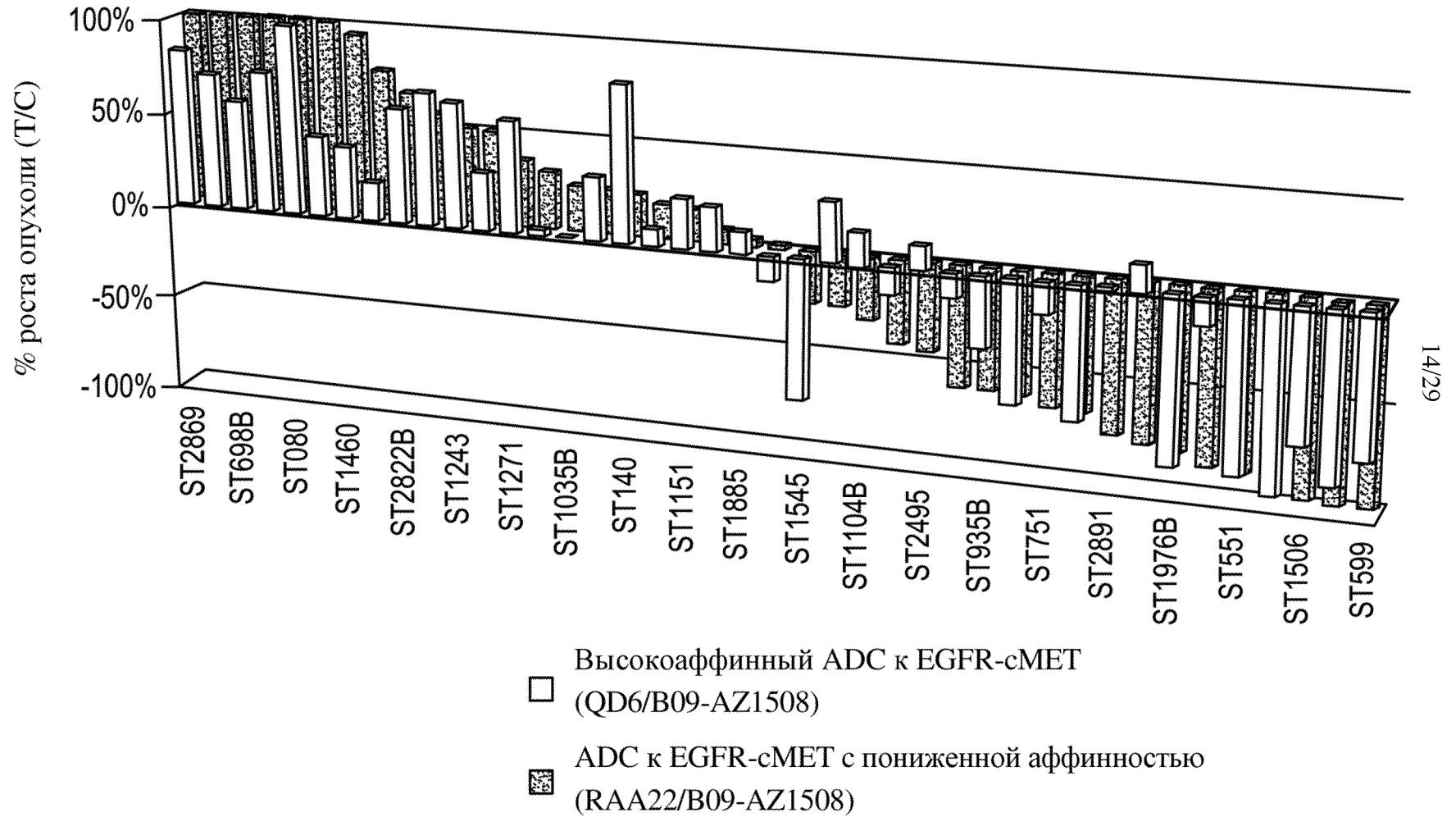


Фиг. 11

Одновалентные ADC к EGFR или cMET характеризуются сниженной активностью в условиях *in vitro* по сравнению с биспецифическими ADC к EGFR/cMET

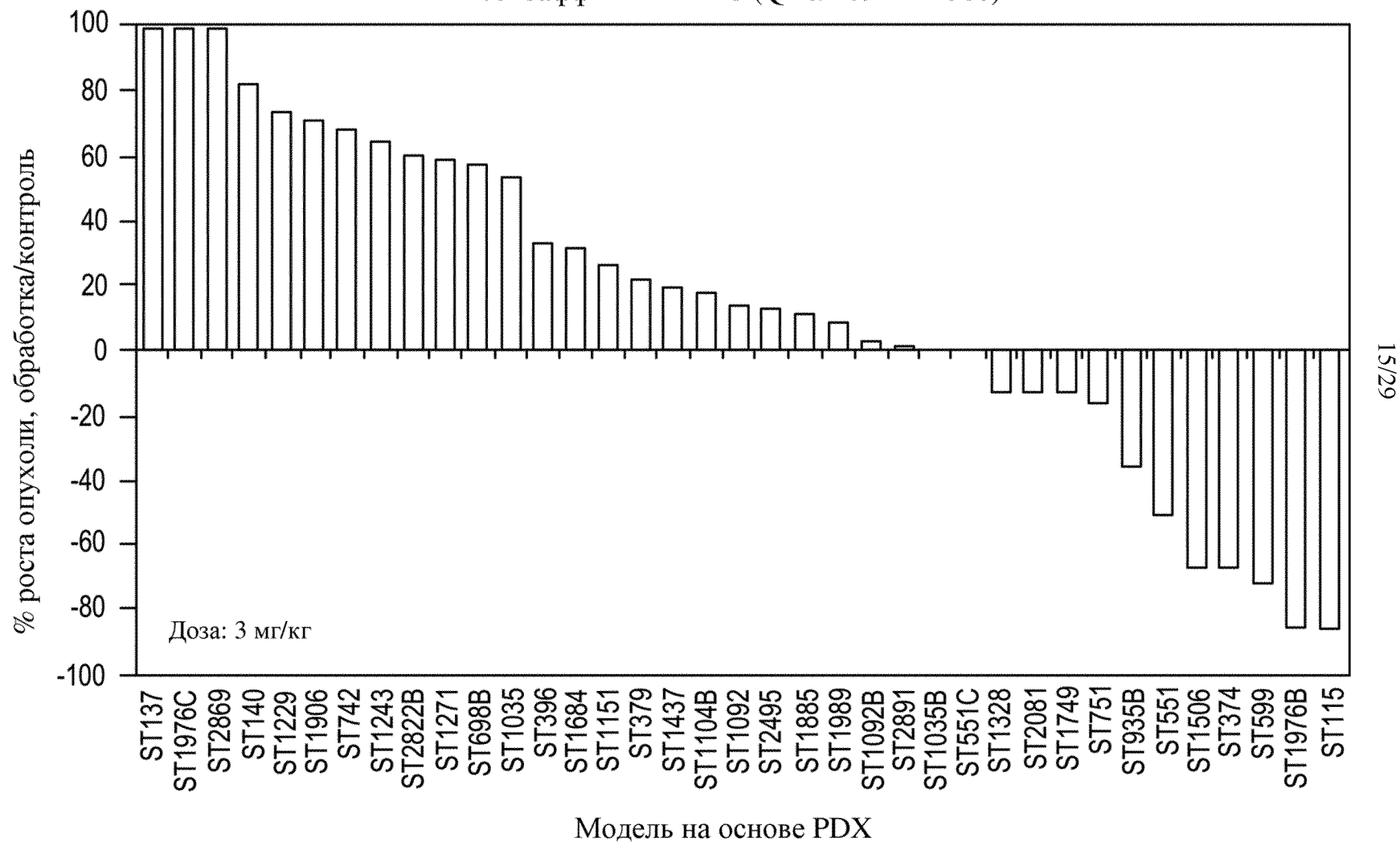


Фиг. 12А



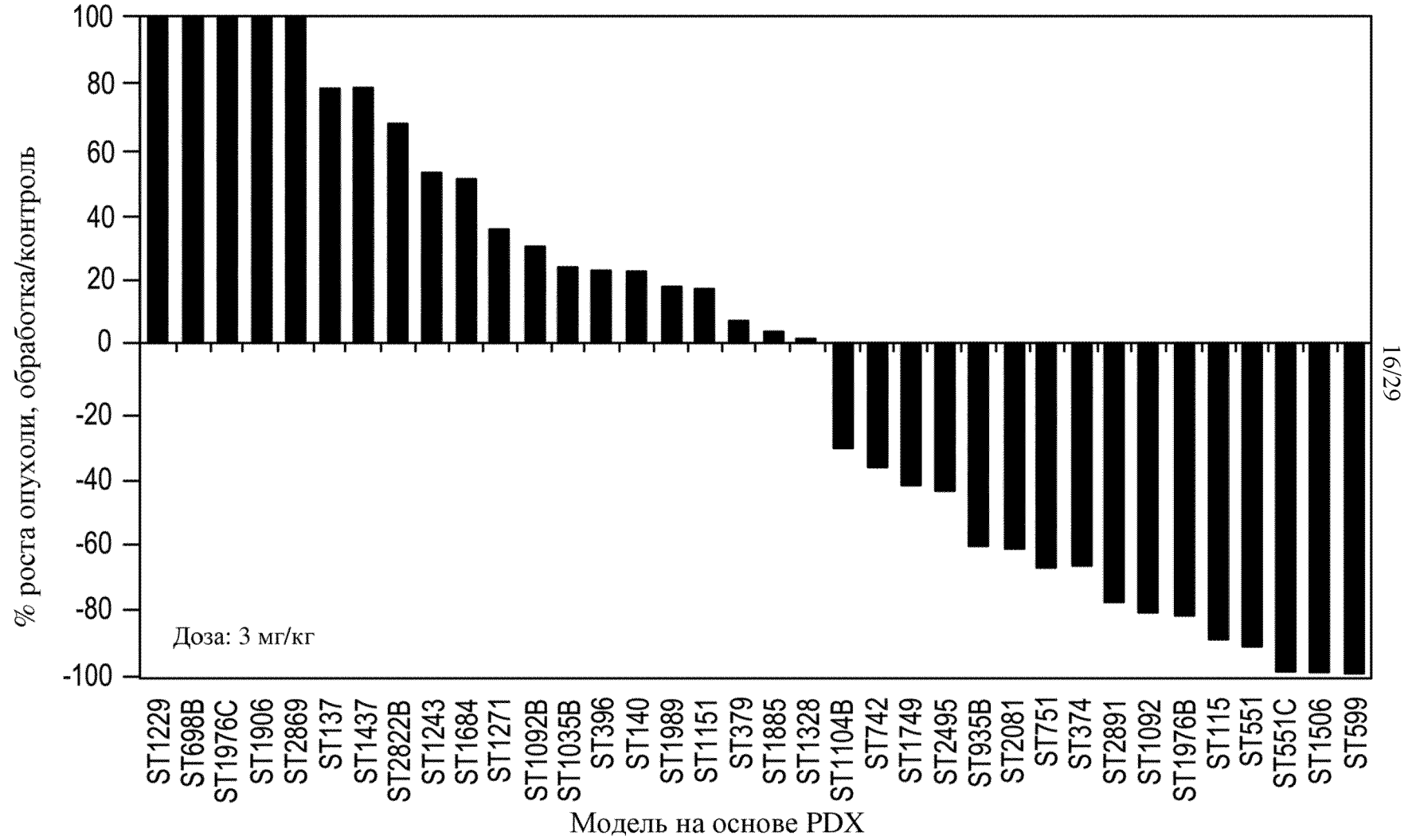
Фиг. 12В

Высокоаффинный ADC (QD6/B09-AZ 1508)

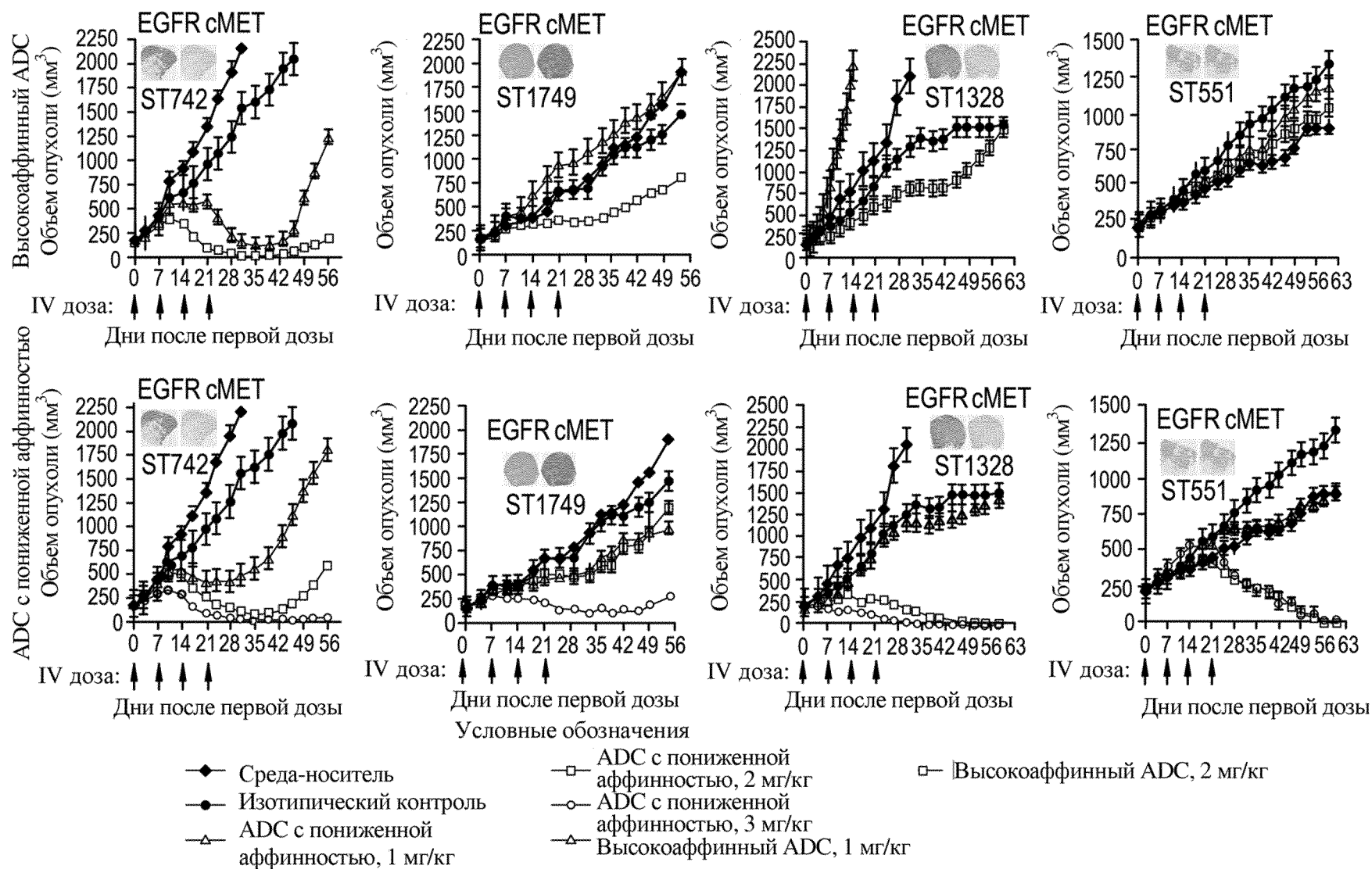


Фиг. 12С

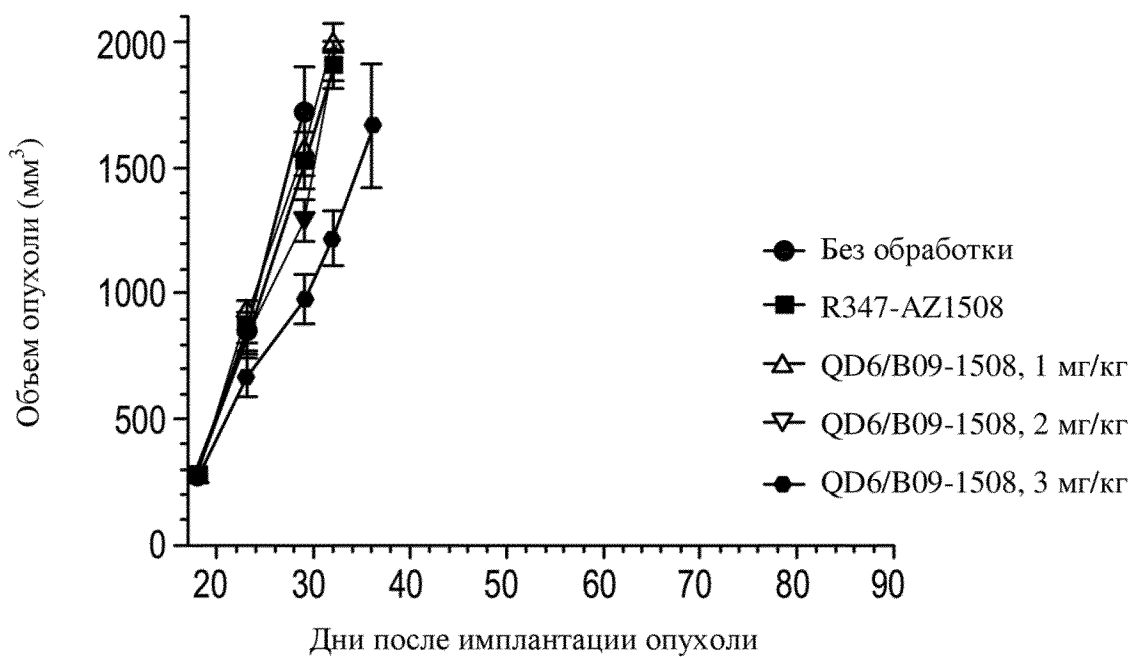
ADC с пониженной аффинностью (RAA22/B09-AZ 1508)



Фиг. 13

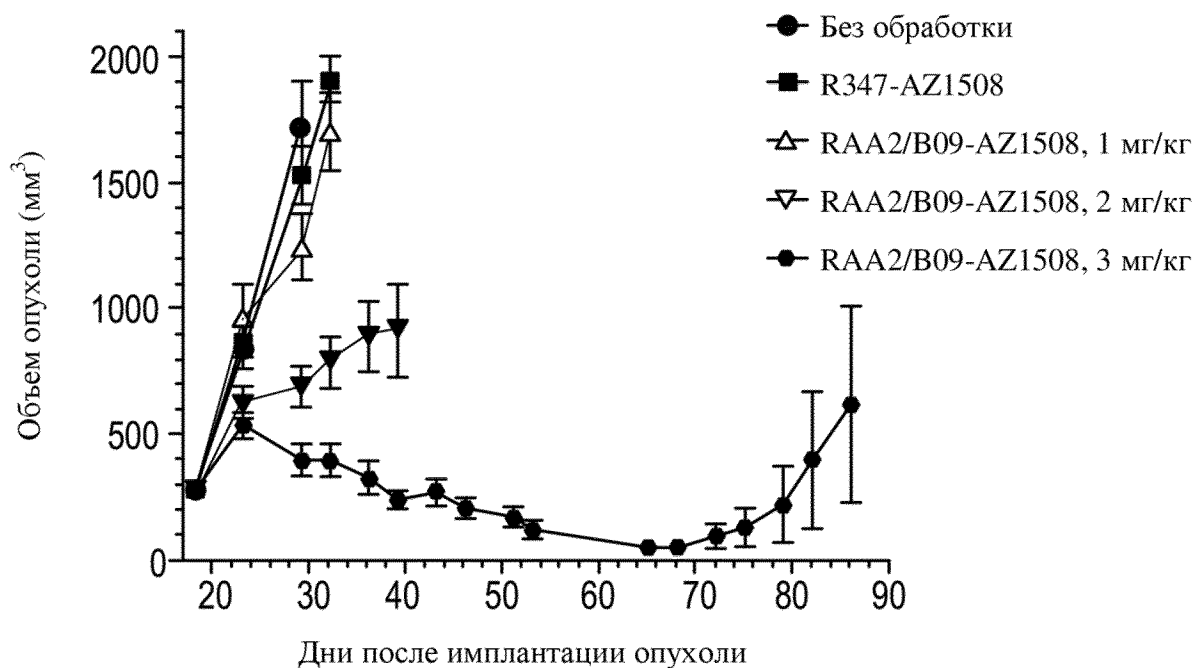


Фиг. 14А
Высокоаффинный EGFR

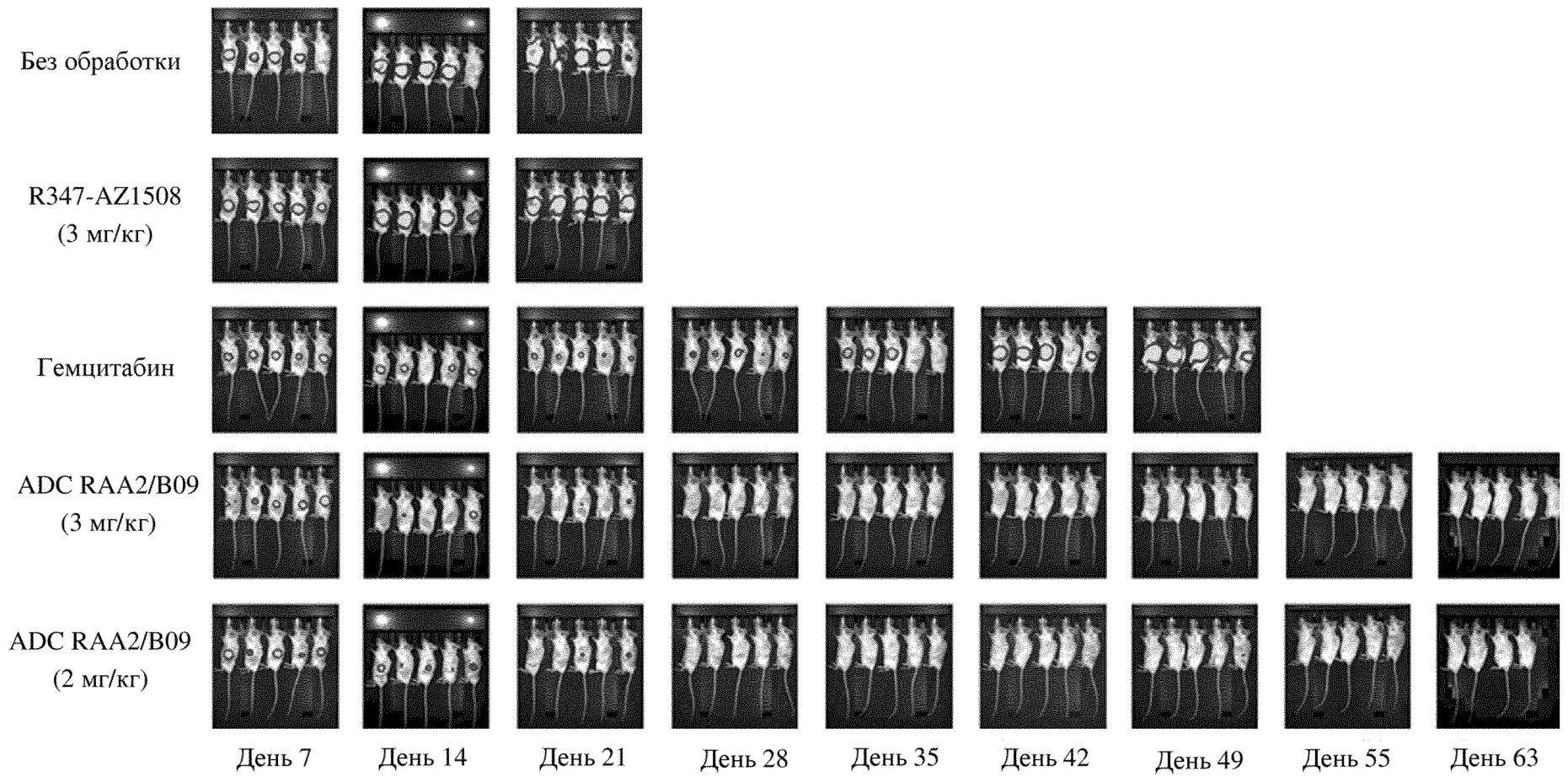


Фиг. 14В

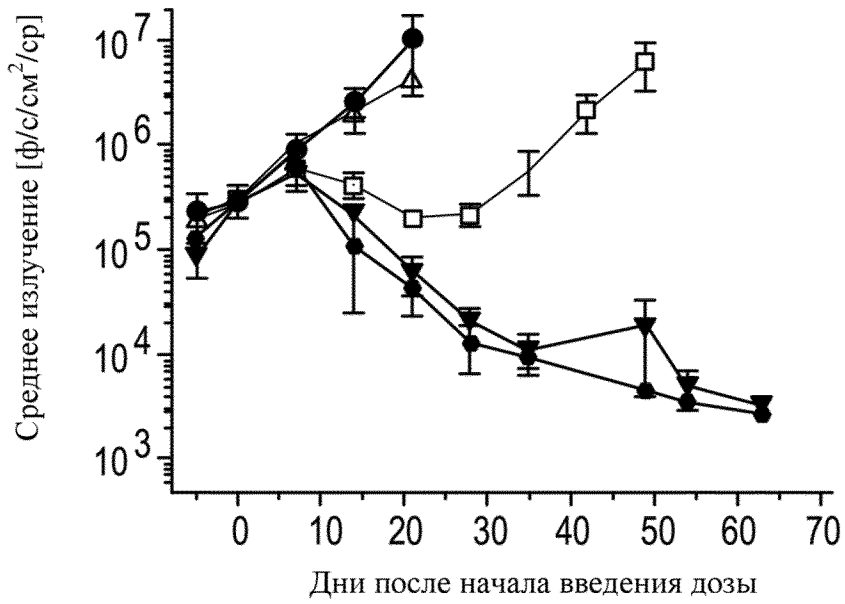
Низкоаффинный EGFR



Фиг. 14С



Фиг. 14D



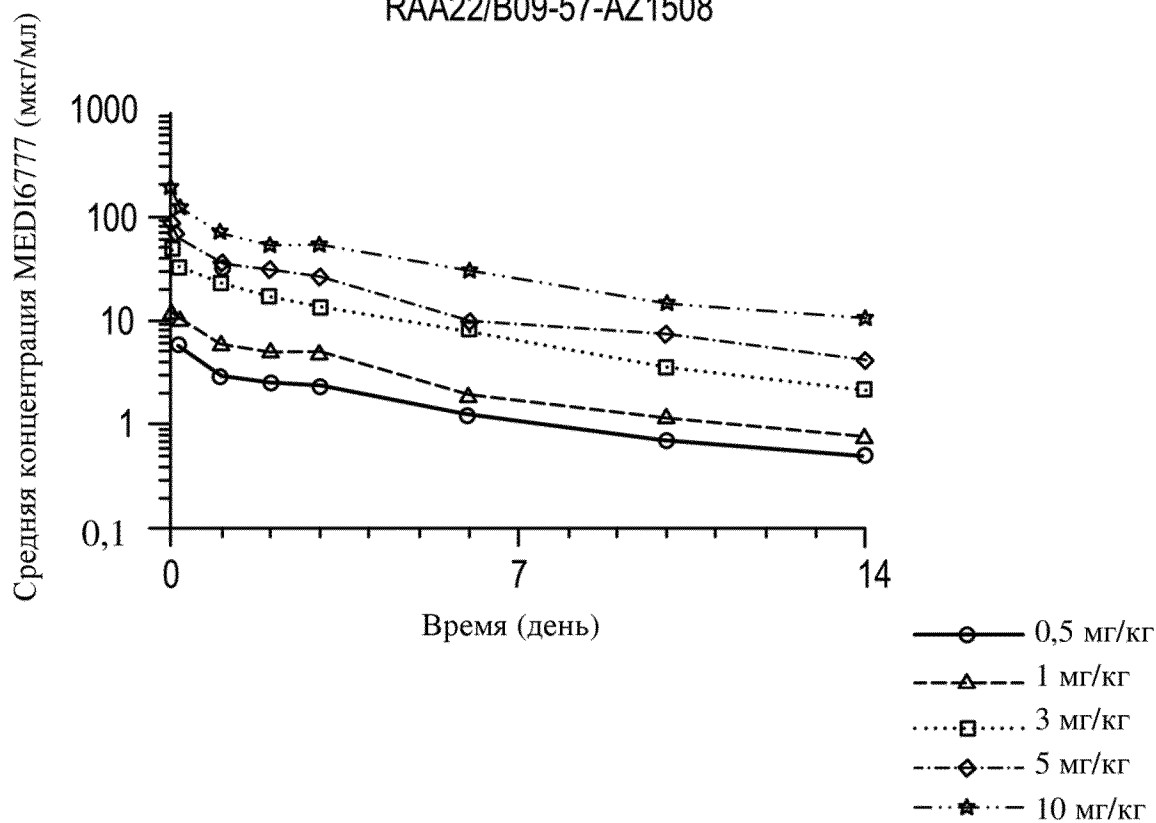
RAA2/B09-AZ1508 ↑ ↑ ↑ ↑

Гемцитабин ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

- Без обработки
- Гемцитабин
- △ R347-AZ1508
- ▼ RAA2/B09-AZ1508, 2 мг/кг
- RAA2/B09-AZ1508, 3 мг/кг

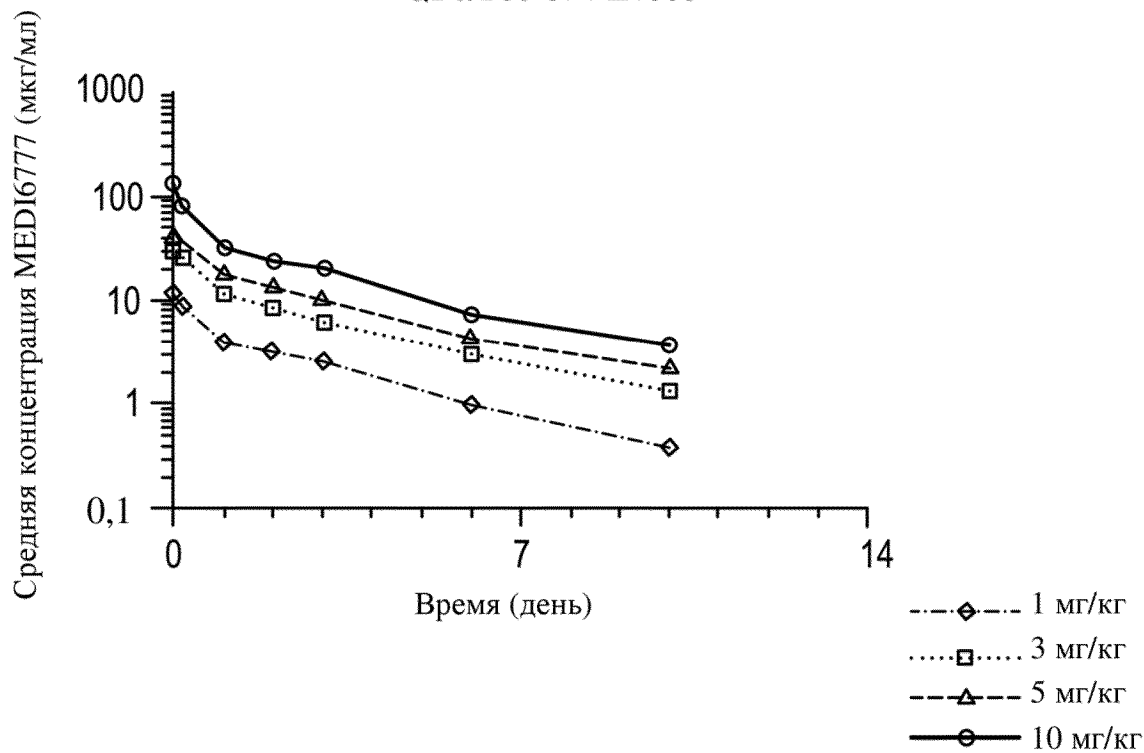
Фиг. 15А

RAA22/B09-57-AZ1508



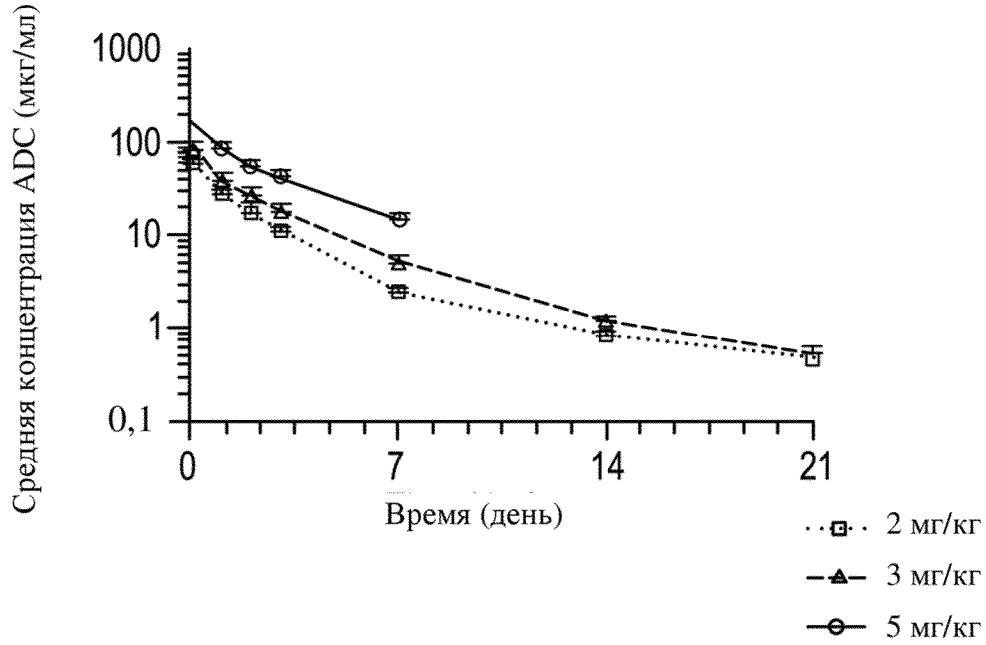
Фиг. 15В

QD6/B09-57-AZ1508



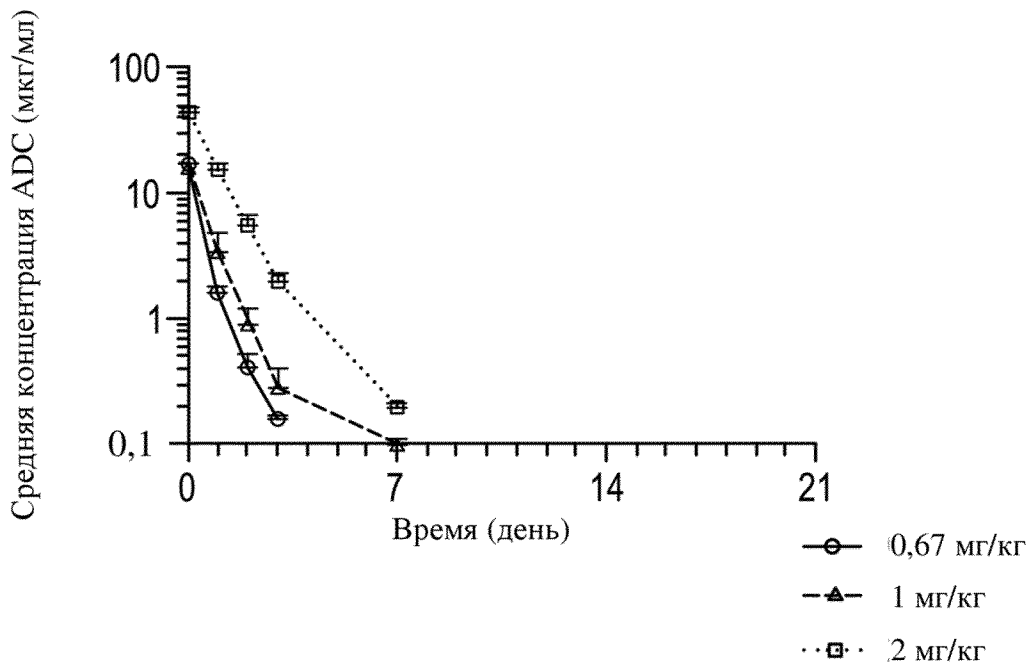
Фиг. 16А

RAA22/B09-57-AZ1508



Фиг. 16В

QD6/B09-57-AZ1508 (20067678)

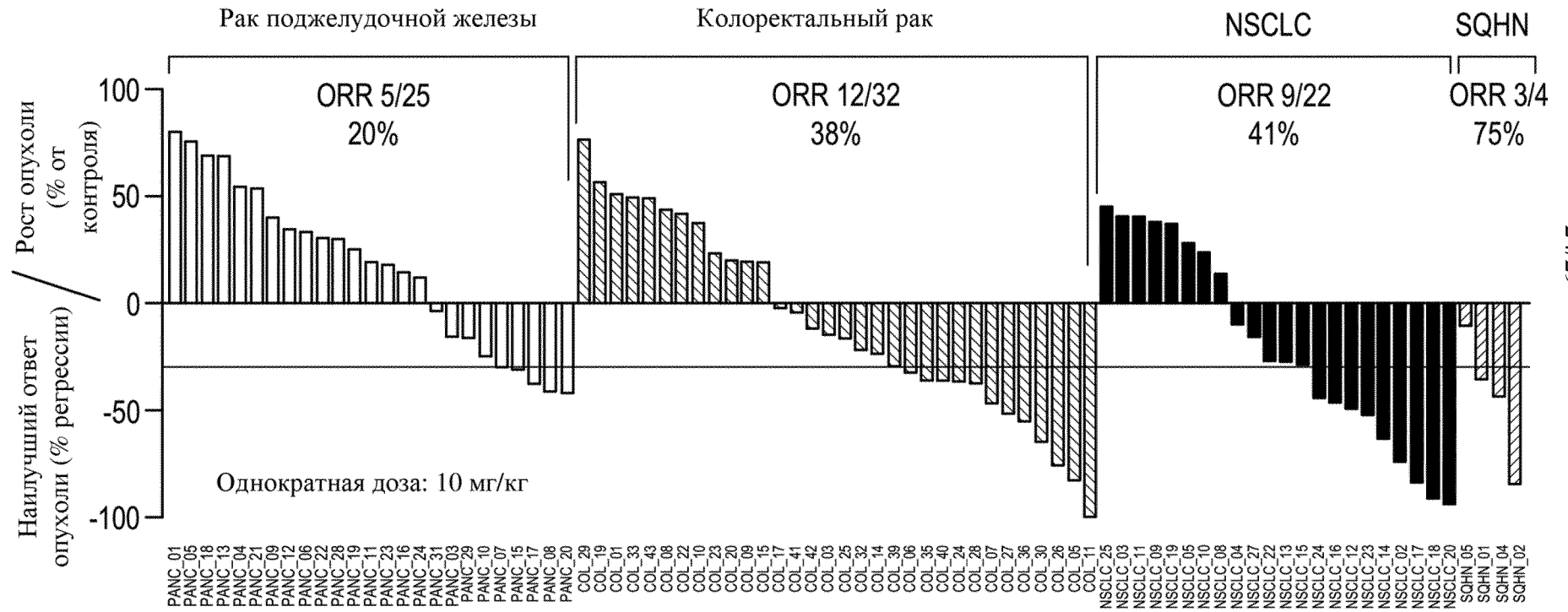


Фиг. 16С

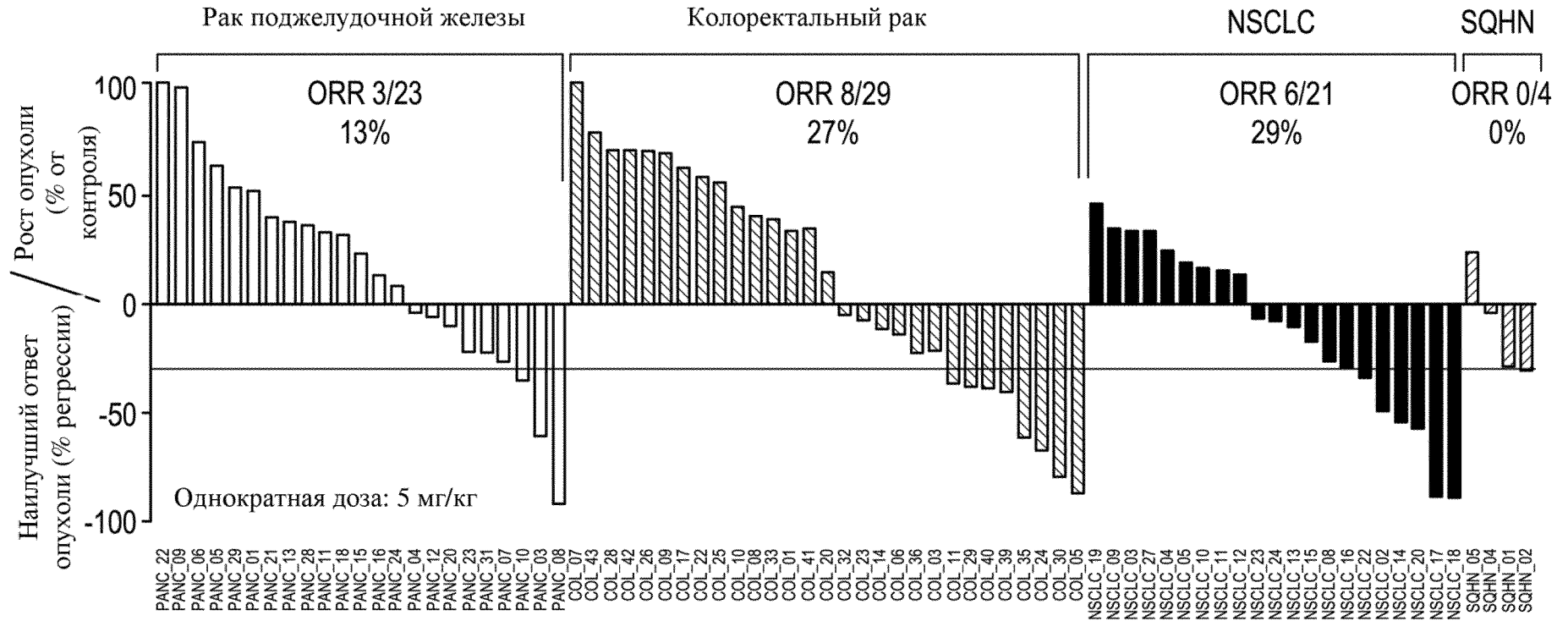
QD6/B09-57-AZ1508 (20067312)

QD6/B09-57-AZ1508 (20067312)			
Параметры РК			
Доза (мг/кг)	1	2	3
C_{\max} (мкг/мл)	20,4	51,4	73,3
AUC (мкг*день/мл)	14,5	52,2	94,4
$t_{1/2}$ (день)	0,491	1,11	0,969
CL (мл/кг/день)	67,8	38,1	31,6

Фиг. 17

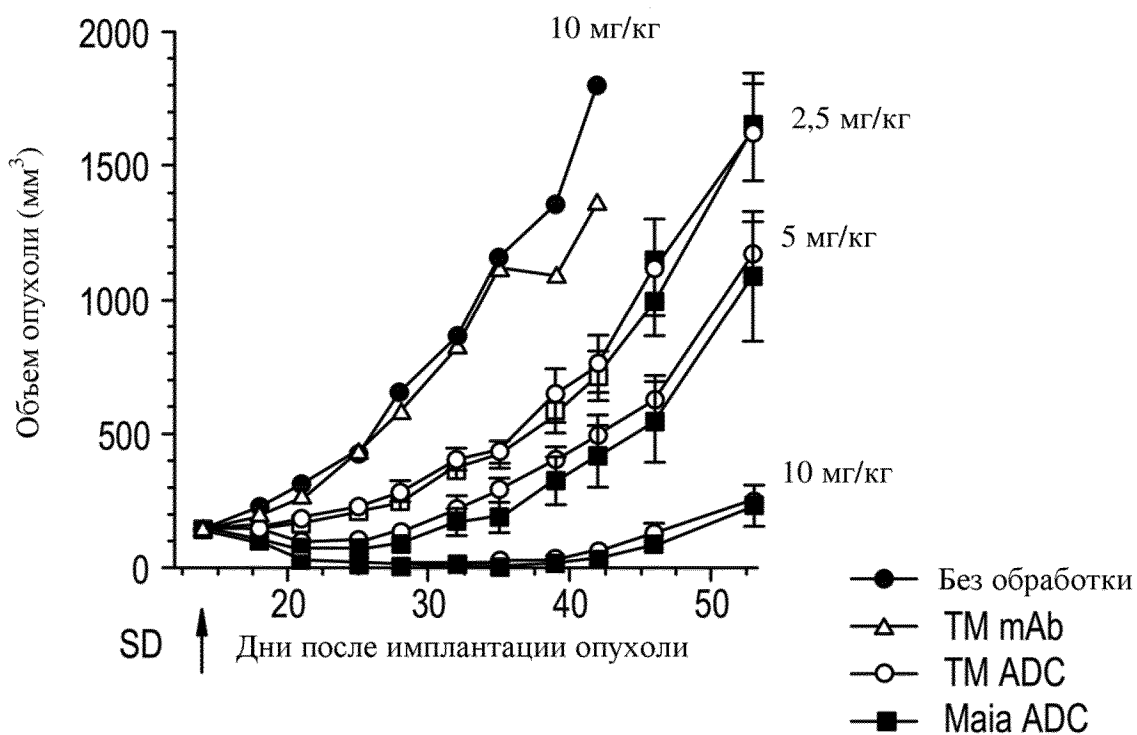


Фиг. 18



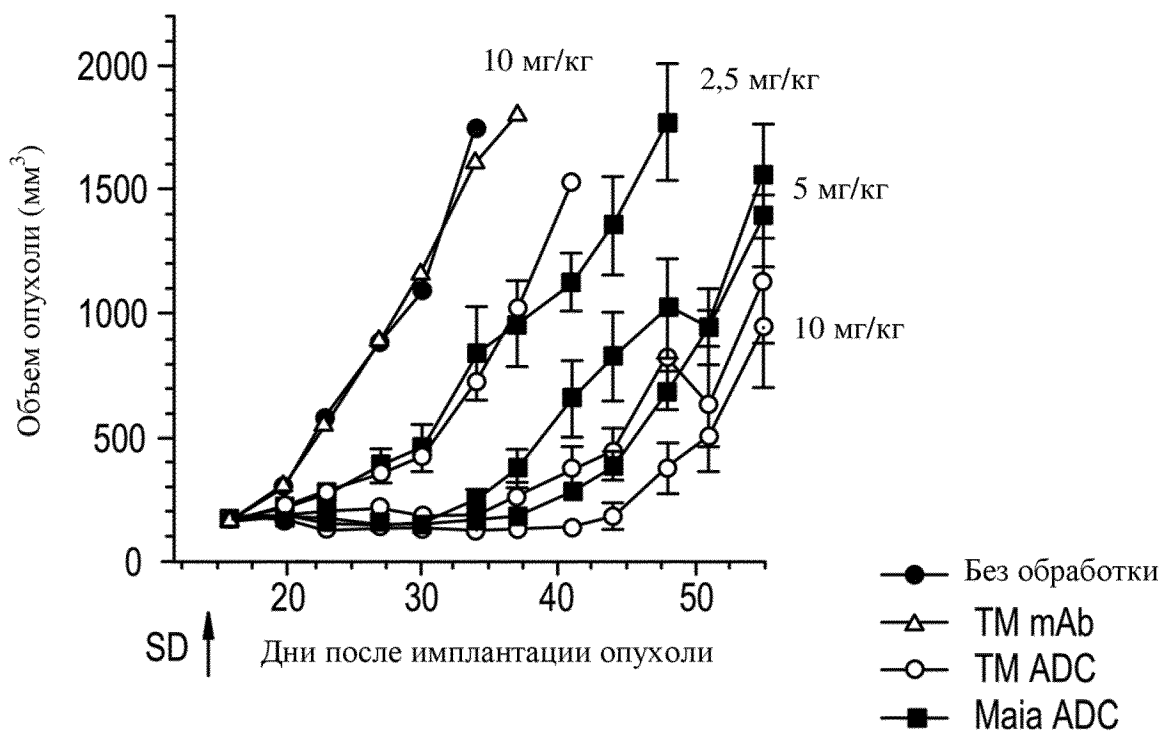
Фиг. 19А

Модель на основе PDX SQHN-02

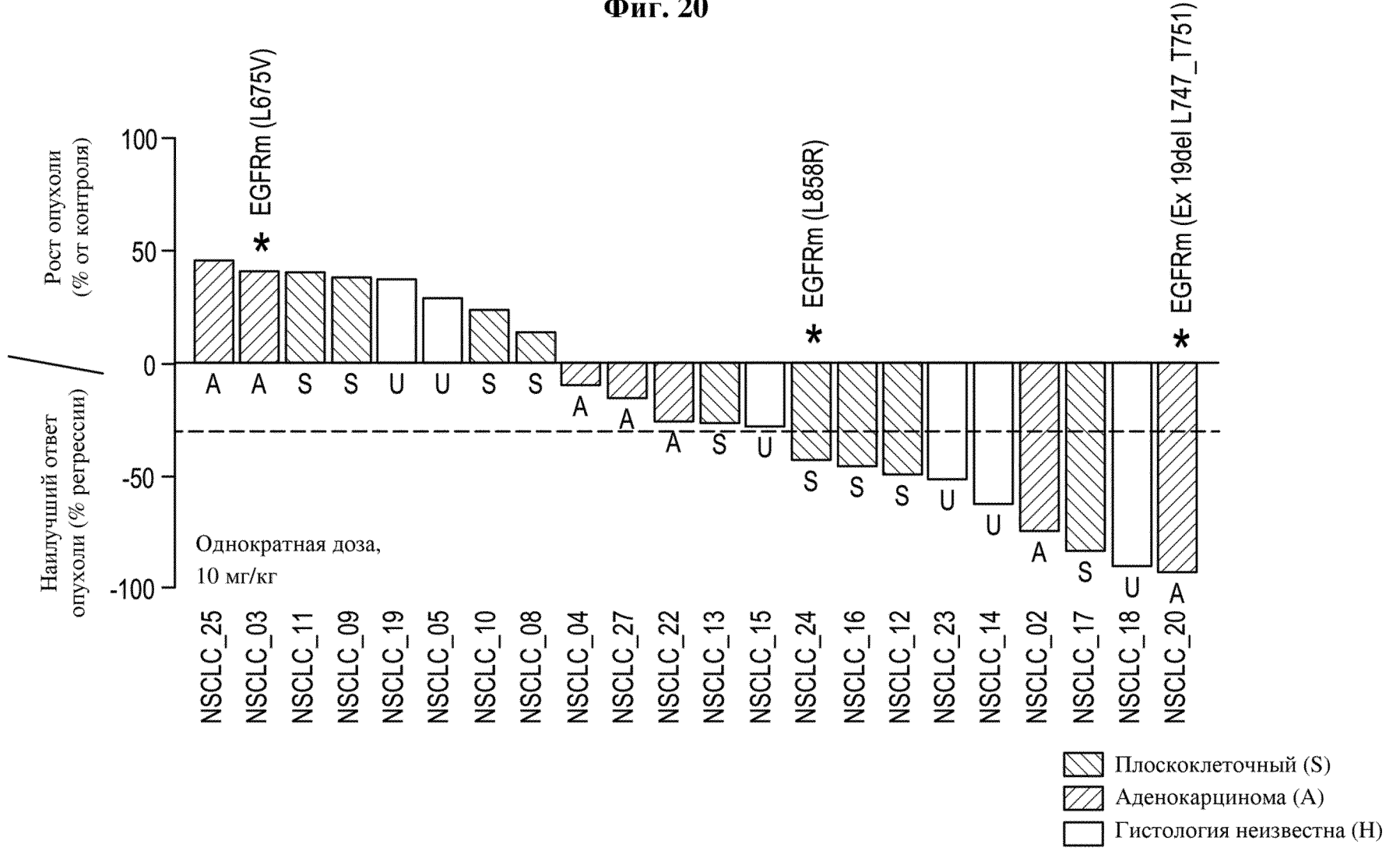


Фиг. 19В

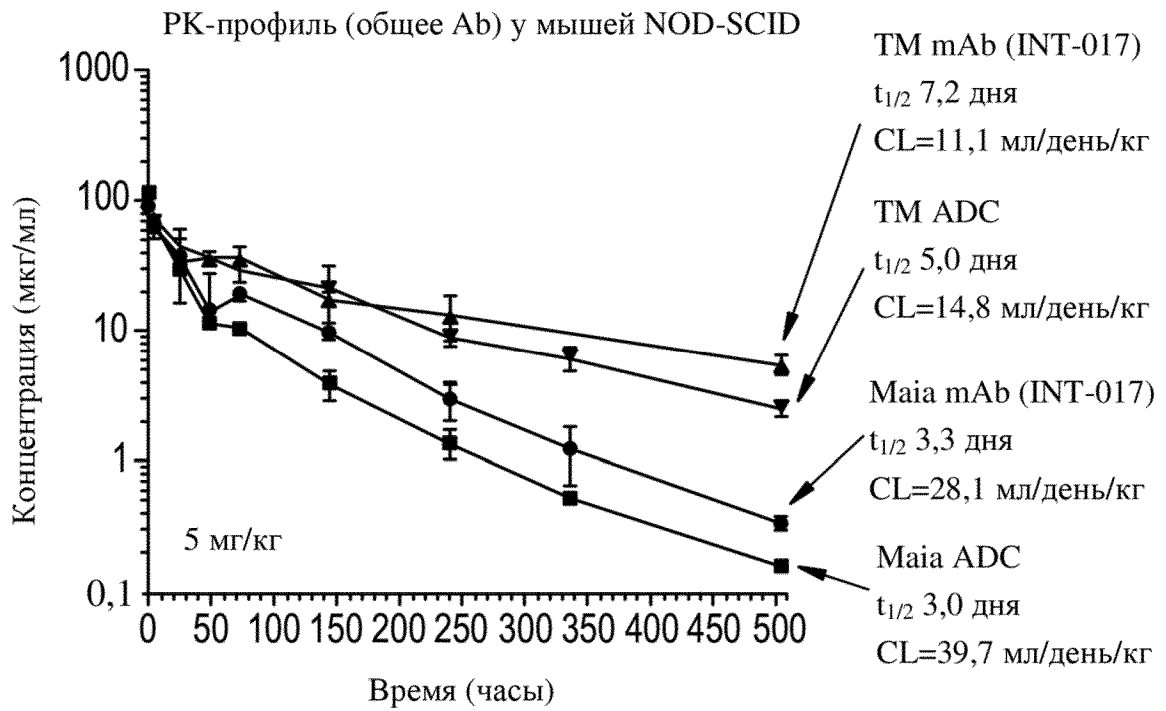
Модель на основе PDX PANC-08



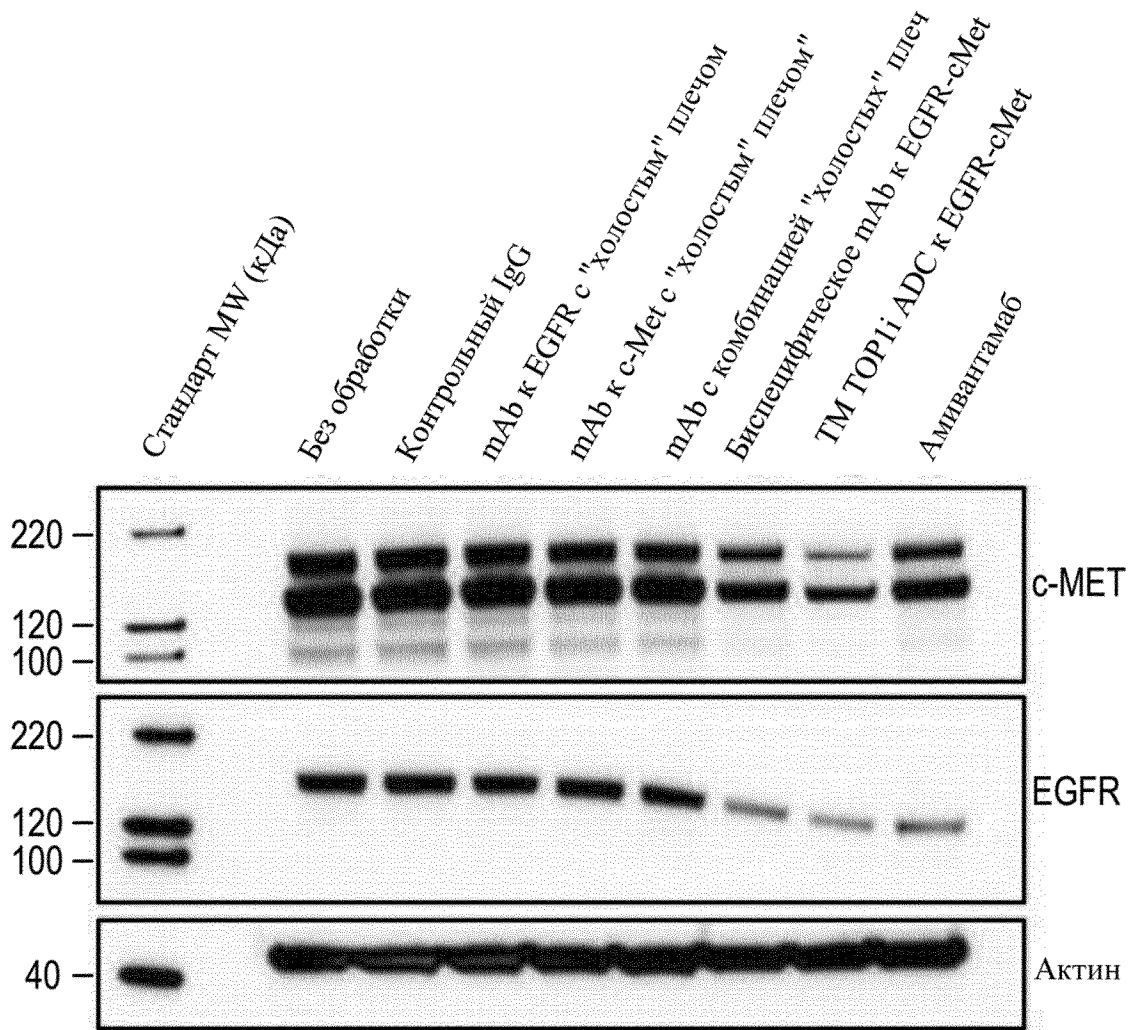
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



24 часа после обработки (10 мкг/мл) в клетках HCC827GR