



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2007131693/15, 15.06.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.01.2005 US 60/645,697(43) Дата публикации заявки: **27.02.2009** Бюл. № 6(45) Опубликовано: **10.01.2012** Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2174409, 10.10.2001. US 2002076695, 20.06.2002. WO 0120033, 22.03.2001. WO 03087131, 23.10.2003. МАКАРОВ В. Иммуноterapia злокачественных новообразований яичников аутологичными препаратами в послеоперационном периоде, 22.09.2003, онлайн [найденo 27.04.2009] [найденo из Интернет]: http://www.neovir.ru/publ_all/publ_canc/pub108. MALIK M.A. et al, (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **21.08.2007**(86) Заявка РСТ:
US 2005/021287 (15.06.2005)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/078307 (27.07.2006)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**ЭЛЛИСОН Дэвид Е. (US),
БРЮНО Рене (FR),
ЛУ Цзянь-Фын (US),
НГ Чее М. (US)**

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**(54) ВВЕДЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ДОЗ HER-АНТИТЕЛ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и предназначена для лечения злокачественной опухоли у больного человека. Вводят по меньшей мере одну фиксированную дозу пертузумаба. Фиксированная доза выбрана из

группы в примерно 420 мг, 525 мг, 840 мг, 1050 мг. Изобретение позволяет упростить выбор дозы для пациента, снизить затраты на индивидуальный подбор дозы пертузумаба. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 4 табл., 14 ил.

(56) (продолжение):

Dose-response studies of recombinant humanized monoclonal antibody 2C4 in tumor xenograft models, Proceedings of the American Association of cancer research annual meeting, vol.44, 2003-07, p.150. WEI Q, Trastuzumab-conjugated boron-containing liposomes for tumor-cell targeting; development and cellular studies, Int J Oncol. 2003 Oct, онлайн [найдено 27.04.2009] [найдено из Интернет]: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963999?ordinalpos=1000&itool=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963999?ordinalpos=1000&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)

[EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963999?ordinalpos=1000&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum).

MANJILI M.H. et al, HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice, J Immunol. 2003 Oct 15, онлайн [найдено 27.04.2009] [найдено из Интернет]: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530326?ordinalpos=983&itool=Entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530326?ordinalpos=983&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)

[System2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530326?ordinalpos=983&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum).

CERSOSIMO R.J. Monoclonal antibodies in the treatment of cancer, Part 2. Am J Health Syst Pharm. 2003 Aug 15, онлайн [найдено 27.04.2009] [найдено из Интернет]: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966906?ordinalpos=997&itool=Entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966906?ordinalpos=997&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)

[System2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966906?ordinalpos=997&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum).

R U 2 4 3 8 7 0 5 C 2

R U 2 4 3 8 7 0 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007131693/15, 15.06.2005**(24) Effective date for property rights:
15.06.2005

Priority:

(30) Priority:
21.01.2005 US 60/645,697(43) Application published: **27.02.2009 Bull. 6**(45) Date of publication: **10.01.2012 Bull. 1**(85) Commencement of national phase: **21.08.2007**(86) PCT application:
US 2005/021287 (15.06.2005)(87) PCT publication:
WO 2006/078307 (27.07.2006)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

**EhLLISON Dehvid E. (US),
BRJuNO Rene (FR),
LU Tszjan'-Fyn (US),
NG Chee M. (US)**

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)**(54) INTRODUCTION OF FIXED DOSES OF HER-ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and is intended for treatment of malignant tumor in patient. At least one fixed dose of pertuzumab is introduced. Fixed dose is selected from

group of approximately 420 mg, 525 mg, 840 m, 1050 mg.

EFFECT: group of inventions makes it possible to simplify dose selection for patient, reduce costs for individual selection of pertuzumab dose.

9 cl, 4 tbl, 14 dwg

Родственные заявки

Настоящая заявка является непредварительной заявкой, поданной согласно 37 CFR 1.53(b), по которой испрашивается приоритет согласно 35 USC §119(e) на основании предварительной заявки 60/645697, поданной 21 января 2005, содержание которой включено в данное описание в виде ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к введению фиксированных доз HER-антител, таких как пертузумаб.

Уровень техникиHER-рецепторы и антитела против них

Представители семейства рецепторных тирозинкиназ HER являются важными медиаторами клеточного роста, дифференцировки и жизнеспособности. Семейство рецепторов включает четыре отдельных представителя, в том числе рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1), HER2 (ErbB2 или p185^{neu}), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4 или tyro2).

EGFR, кодируемый геном *erbB1*, причинно вовлечен в развитие злокачественных новообразований у человека. В частности, повышенную экспрессию EGFR наблюдали в злокачественной опухоли молочной железы, мочевого пузыря, легкого, головы, шеи и желудка, а также при глиобластомах. Повышенная экспрессия рецептора EGFR часто связана с повышенной продукцией лиганда EGFR, трансформирующего фактора роста альфа (TGF- α), некоторыми опухолевыми клетками, приводящей к активации рецептора посредством аутокринного пути стимуляции. Baselga and Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Моноклональные антитела, направленные против EGFR или его лигандов, TGF- α и EGF, оценивали в качестве терапевтических средств при лечении таких злокачественных заболеваний. См., например, Baselga and Mendelsohn, *выше*; Masui et al. *Cancer Research* 44 1002-1007 (1984) и Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

Второй представитель семейства HER, p185^{neu}, исходно идентифицировали в качестве продукта трансформирующего гена из нейробластом химически обработанных крыс. Активированная форма протоонкогена *neu* возникает в результате точечной мутации (валин на глутаминовую кислоту) в трансмембранной области кодируемого белка. Амплификацию гомолога *neu* человека наблюдали при раке молочной железы и яичника, что коррелировало с плохим прогнозом (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); и патент США №4968603). До настоящего времени не сообщалось о точечной мутации, аналогичной точечной мутации в протоонкогене *neu*, для опухолей человека. Сверхэкспрессию HER2 (часто, но не всегда вследствие амплификации гена) также наблюдали в других карциномах, включая карциномы желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, ободочной кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы и мочевого пузыря. См. наряду с другими публикациями King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams et al., *Pathobiology* 59:46-52 (1991); и McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 может быть сверхэкспрессирован в злокачественной опухоли простаты (Gu et al., *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross et al., *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997);

Ross et al., Cancer 79:2162-70 (1997); и Sadasivan et al., J. Urol. 150:126-31 (1993)).

Описаны антитела, направленные против белковых продуктов p185^{neu} крысы и HER2 человека.

Drebin с соавторами получили антитела против продукта гена *neu* крысы, p185^{neu}. См., например, Drebin et al., Cell 41:695-706 (1985); Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290 (1991); и WO 94/22478. В публикации Drebin et al. Oncogene 2:273-277 (1988) сообщается, что смеси антител, взаимодействующих с двумя разными областями p185^{neu}, приводят к синергистическому противоопухолевому воздействию на *neu*-трансформированные клетки NIH-3T3, имплантированные мышам nude. См. также патент США №5824311, опубликованный 20 октября 1998.

В публикации Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989), описано создание панели антител к HER2, которые характеризовали с использованием линии клеток опухоли молочной железы человека SK-BR-3. Относительную пролиферацию клеток SK-BR-3 после воздействия антител определяли окрашиванием монослоя кристаллическим фиолетовым через 72 часа. Используя такой анализ, максимальное ингибирование получали с использованием антитела, названного 4D5, которое ингибировало пролиферацию клеток на 56%. Другие антитела в панели при данном анализе снижали пролиферацию клеток в меньшей степени. Кроме того, обнаружено, что антитело 4D5 сенсibiliзировало линии опухолевых клеток молочной железы, сверхэкспрессирующие HER2, к цитотоксическому действию TNF- α . См. также патент США №5677171, опубликованный 14 октября 1997. HER2-антитела, обсуждаемые в работе Hudziak et al., дополнительно охарактеризованы в публикациях Fendly et al. Cancer Research 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. In Vitro 26(3):59A (1990); Sarup et al. Growth Regulation 1:72-82 (1991); Shepard et al. J. Clin. Immunol. 11(3):117-127 (1991); Kumar et al. Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986 (1991); Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993); Pietras et al. Oncogene 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al. Cancer Research 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665 (1994); Scott et al. J. Biol. Chem. 266:14300-5 (1991); D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206 (1994); Lewis et al. Cancer Research 56:1457-1465 (1996) и Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997).

Рекомбинантный гуманизированный вариант мышинового HER2-антитела 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, трастузумаб или HERCEPTIN®; патент США №5821337) является клинически активным у пациентов со злокачественными опухолями молочной железы, сверхэкспрессирующими HER2, которые получали всестороннюю предварительную противоопухолевую терапию (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). Трастузумаб был разрешен для реализации управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами 25 сентября 1998 для лечения пациентов с метастатическим раком молочной железы, опухоли у которых сверхэкспрессируют белок HER2.

Другие HER2-антитела с различными свойствами описаны в публикациях Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); патент США №5783186 и Klapper et al. Oncogene 14:2099-2109 (1997).

Скрининг гомологии привел к идентификации двух других представителей семейства рецепторов HER; HER3 (патенты США №5183884 и 5480968, а также Kraus et al., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)) и HER4 (заявка на выдачу патента EP №599274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); и Plowman et al., Nature, 366: 473-475 (1993)). Оба указанных рецептора проявляют повышенную экспрессию по меньшей мере в некоторых линиях клеток рака молочной железы.

Рецепторы HER обычно обнаруживают в клетках в различных комбинациях и считают, что гетеродимеризация увеличивает разнообразие клеточных ответов на множество лигандов HER (Earp et al. Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995)). EGFR связывается шестью разными лигандами; эпидермальным фактором роста (EGF), трансформирующим фактором роста альфа (TGF- α), амфирегулином, связывающим гепарин эпидермальным фактором роста (HB-EGF), бетацеллюлином и эпирегулином (Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)). Семейство белков херегулинов, образуемых в результате альтернативного сплайсинга одного гена, являются лигандами для HER3 и HER4. Семейство херегулинов включает альфа-, бета- и гамма-херегулины (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); патент США №5641869 и Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)); факторы дифференцировки neu (NDF), глиальные факторы роста (GGF); активность, индуцирующую рецептор ацетилхолина (ARIA); и фактор, полученный из сенсорных и мотонейронов (SMDF). Обзор см. в публикации Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. and Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996) и Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995). Недавно идентифицированы три дополнительных лиганда HER; нейрегулин-2 (NRG-2), который, как сообщается, связывает либо HER3, либо HER4 (Chang et al. Nature 387:509-512 (1997) и Carraway et al. Nature 387:512-516 (1997)); нейрегулин-3, который связывает HER4 (Zhang et al. PNAS (USA) 94(18):9562-7 (1997)); и нейрегулин-4, который связывает HER4 (Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, бетацеллюлин и эпирегулин также связываются с HER4.

Хотя EGF и TGF α не связывают HER2, EGF стимулирует EGFR и HER2 к образованию гетеродимера, который активирует EGFR и приводит к трансфосфорилированию HER2 в гетеродимере. Димеризация и/или трансфосфорилирование, по-видимому, активируют тирозинкиназу HER2, см. Earp et al., выше. Подобным образом, когда HER3 коэкспрессируется с HER2, образуется активный комплекс передачи сигнала, и антитела, направленные против HER2, способны разрушать такой комплекс (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994)). Кроме того, аффинность HER3 по отношению к херегулину (HRG) повышается до состояния более высокой аффинности в случае коэкспрессии с HER2. См. также Levi et al., Journal of Neuroscience 15:1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1431-1435 (1995); и Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465 (1996), в отношении комплекса белков HER2-HER3. HER4, подобно HER3, образует активный комплекс передачи сигнала с HER2 (Carraway and Cantley, Cell 78:5-8 (1994)).

Патентные публикации, относящиеся к HER-антителам, включают: US 5677171, US 5720937, US 5720954, US 5725856, US 5770195, US 5772997, US 6165464, US 6387371, US 6399063, US 2002/0192211 A1, US 6015567, US 6333169, US 4968603, US 5821337, US 6054297, US 6407213, US 6719971, US 6800738, US 2004/0236078 A1, US 5648237, US 6267958, US 6685940, US 6821515, WO 98/17797, US 6127526, US 6333398, US 6797814, US 6339142, US 6417335, US 6489447, WO 99/31140, US 2003/0147884 A1, US 2003/0170234 A1, US 2005/0002928 A1, US 6573043, US 2003/0152987 A1, WO 99/48527, US 2002/0141993 A1, WO 01/00245, US 2003/0086924, US 2004/0013667 A1, WO 00/69460, WO 01/00238, WO

01/15730, US 6627196 B1, US 6632979 B1, WO 01/00244, US 2002/0090662 A1, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 04/24866, US 2004/0082047, US 2003/0175845 A1, WO 03/087131, US 2003/0228663, WO 2004/008099 A2, US 2004/0106161, WO 2004/048525, US 2004/0258685 A1, US 5985553, US 5747261, US 4935341, US 5401638, US 5604107, WO
 5 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412116 B1, EP 494135 B1, US 5824311, EP 444181 B1, EP 1006194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5571894, US 5939531, EP 502812 B1, WO 93/03741, EP 554441 B1, EP 656367 A1, US 5288477, US 5514554, US 5587458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5877305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5856089, WO
 10 94/22478, US 5910486, US 6028059, WO 96/07321, US 5804396, US 5846749, EP 711565, WO 96/16673, US 5783404, US 5977322, US 6512097, WO 97/00271, US 6270765, US 6395272, US 5837243, WO 96/40789, US 5783186, US 6458356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6214388, US 5925519, WO 98/02463, US 5922845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5994071, WO 98/45479, US 6358682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695
 15 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO 02/05791, WO 02/11677, US 6582919, US 2002/0192652 A1, US 2003/0211530 A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6602670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO
 20 03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1357132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5705157, US 6123939, EP 616812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6403630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6333348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6767541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO
 25 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 и WO 03/86467.

Диагностика

Пациентов, подвергаемых лечению HER2-антителом трастузумабом, отбирали для
 30 терапии на основании сверхэкспрессии/амплификации HER2. См., например, WO 99/31140 (Paton et al.), US 2003/0170234A1 (Hellmann, S.) и US 2003/0147884 (Paton et al.); а также WO 01/89566, US 2002/0064785 и US 2003/0134344 (Mass et al.). См. также патент US 2003/0152987, Cohen et al., касающийся иммуногистохимии (ИHC) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для выявления сверхэкспрессии и
 35 амплификации HER2.

WO 2004/053497 (Bacus et al.) относится к определению или прогнозированию ответа на терапию HERCEPTIN®. US 2004/013297 A1 (Bacus et al.) касается определения или прогнозирования ответа на терапию EGFR-антителом ABX0303. WO 2004/000094 (Bacus
 40 et al.) относится к определению ответа на GW572016, малую молекулу, ингибитор тирозинкиназы EGFR-HER2. WO 2004/063709, Amler et al., относится к биомаркерам и способам определения чувствительности к ингибитору EGFR, эрлотинибу·HCl. US 2004/0209290, Cobleigh et al., относится к маркерам экспрессии генов для прогнозирования рака молочной железы.

Пациентов, подвергаемых лечению пертузумабом, можно отбирать для терапии на
 45 основании активации или димеризации HER. Патентные публикации, касающиеся пертузумаба и отбора пациентов для терапии пертузумабом, включают: WO 01/00245 (Adams et al.); US 2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US 2004/0013667 A1 (Sliwkowski, M.); а также WO 2004/008099 A2 и US 2004/0106161 (Bossenmaier et al.).
 50

Cronin et al., Am. J. Path. 164(1):35-42 (2004), описывает измерение экспрессии генов в архивных залитых в парафин тканях. Ma et al. Cancer Cell 5:607-616 (2004) описывает получение генных профилей посредством генных олигонуклеотидных микрочипов с

использованием выделенной РНК из срезов опухолевых тканей, взятых из архивных первичных биопсий.

Дозирование противоопухолевых лекарственных средств и HER-антител

Публикации, в которых обсуждается дозирование противораковых лекарственных средств, включают: Egorin, M. J. Clin Oncol 2003; 21:182-3 (2003); Baker et al. J. Natl. Cancer Inst. 94:1883-8 (2002); Felici et al. Eur. J. Cancer 38:1677-84 (2002); Loos et al. Clin. Cancer Res. 6:2685-9(2000); de Jongh et al. J. Clin. Oncol. 19:3733-9(2001); Mathijssen et al. J. Clin. Oncol. 20:81-7 (2002) и de Jong et al. Clin Cancer Res 10:4068-71 (2004).

Обычно коммерчески доступные гуманизированные моноклональные IgG-антитела (например, трастузумаб и бевацизумаб, Genentech Inc., South San Francisco, и гемтузумаб озогомицин, Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia) и цитотоксические низкомолекулярные лекарственные средства в онкологии вводили способом дозирования на основе массы (мг/кг) или на основе площади поверхности тела (BSA).

Цетуксимаб (ERBITUX®) представляет собой антитело, которое связывает рецептор EGF и которое одобрено для терапии рака прямой и ободочной кишки. При раке прямой и ободочной кишки 400 мг/м² цетуксимаба вводят в качестве ударной дозы внутривенной инфузией в течение 2 часов. После этого один раз в неделю вводят поддерживающие дозы 250 мг/м² в течение 1 часа. См. указания по применению цетуксимаба.

Трастузумаб (HERCEPTIN®) вводят пациентам с метастатическим раком молочной железы в виде ударной дозы 4 мг/кг, затем в виде еженедельных доз 2 мг/кг. См. указания по применению трастузумаба.

См. также WO 99/31140; US 2003/0147884 A1; US 2003/0170234 A1; US 2005/0002928 A1; WO 00/69460; WO 01/15730 и патент США №6627196 B1, относящийся к дозированию трастузумаба.

Пертузумаб (также известный как рекомбинантное моноклональное антитело человека 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc, South San Francisco) является первым представителем в новом классе средств, известных как ингибиторы димеризации HER (HDI), и функционирует, ингибируя способность HER2 образовывать активные гетеродимеры с другими рецепторами HER (такими как EGFR/HER1, HER3 и HER4), и является активным независимо от уровней экспрессии HER2. См., например, Harari and Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000); Yarden and Sliwkowski, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:127-37 (2001); Sliwkowski Nat. Struct. Biol. 10:158-9 (2003); Cho et al. Nature 421:756-60 (2003); и Malik et al. Pro. Am. Soc. Cancer Res. 44:176-7 (2003).

Показано, что блокада пертузумабом формирования гетеродимеров HER2-HER3 в опухолевых клетках ингибирует важную передачу сигнала в клетках, что приводит к сниженной пролиферации и жизнеспособности опухоли (Agus et al. Cancer Cell 2:127-37 (2002)).

Пертузумаб подвергали тестированию в качестве отдельного средства в клиническом испытании фазы Ia у пациентов со злокачественными опухолями на поздней стадии и в испытаниях фазы II у пациентов с раком яичника и раком молочной железы, а также раком легкого и простаты. В исследовании фазы I пациентов с неизлечимыми, местно распространенными, рецидивными или метастатическими солидными опухолями, которые прогрессировали во время или после стандартной терапии, лечили пертузумабом, вводимым внутривенно один раз в 3 недели. Пертузумаб обычно был хорошо переносимым. Уменьшения опухоли достигали у 3 из 20 пациентов, у которых оценивали ответ. У двух пациентов были подтверждены частичные ответы. Стабильное заболевание, продолжающееся более 2,5

месяцев, наблюдали у 6 из 21 пациента (Agus et al. Pro. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:192 (2003)). В дозах 2,0-15 мг/кг фармакокинетика пертузумаба была линейной, и средний клиренс находился в диапазоне от 2,69 до 3,74 мл/сутки/кг, а средний конечный период полувыведения фазы элиминации находился в диапазоне от 15,3 до 27,6 суток.

Антитела к пертузумабу не были выявлены (Allison et al. Pro. Am. Soc. Clin. Oncol. 22: 197 (2003)). Дозирование пертузумаба осуществляли на основе массы (мг/кг) в фазе I испытания. Испытания в фазе II инициировали, используя фиксированную дозу.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к первой критической оценке воздействия и применимости введения фиксированных доз гуманизированного моноклонального IgG1-антитела на фармакокинетику и концентрации целевого лекарственного средства. Основными целями данного анализа HER-антитела пертузумаба были: 1) оценка популяционных фармакокинетических и прогностических ковариат для пертузумаба у онкологических пациентов и 2) исследование вариативности минимальных устойчивых концентраций и воздействий после введения фиксированной дозы или введения доз на основе массы тела и площади поверхности тела (BSA).

Соответственно, в первом аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему в себя введение одной или нескольких фиксированных доз HER-антитела больному человеку в количестве, эффективном для лечения злокачественной опухоли.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у больного человека, включающему в себя введение по меньшей мере одной фиксированной дозы пертузумаба пациенту, где фиксированная доза выбрана из группы, состоящей из примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг и примерно 1050 мг пертузумаба.

Изобретение также относится к изделию производства, состоящему из флакона, содержащего фиксированную дозу HER-антитела, где фиксированная доза выбрана из группы, состоящей из примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг и примерно 1050 мг HER-антитела.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 представлена схема структуры белка HER2 и аминокислотные последовательности доменов I-IV (SEQ ID No. 19-22, соответственно) его внеклеточного домена.

На фиг.2A и 2B изображены выравнивания аминокислотных последовательностей вариативного домена легкой цепи (V_L) (фиг.2A) и вариативного домена тяжелой цепи (V_H) (фиг.2B) мышинового моноклонального антитела 2C4 (SEQ ID No. 1 и 2, соответственно); доменов V_L и V_H гуманизированного варианта 2C4 574 (SEQ ID No. 3 и 4, соответственно) и консенсусных каркасов V_L и V_H человека (hum κ 1, подгруппа I легкой цепи каппа; hum λ 3, подгруппа III тяжелой цепи) (SEQ ID No. 5 и 6, соответственно). Звездочки указывают различия между гуманизированным вариантом 2C4 574 и мышинным моноклональным антителом 2C4 или между гуманизированным вариантом 2C4 574 и каркасом антитела человека. Определяющие комплементарность области (CDR) показаны в квадратных скобках.

На фиг.3A и 3B показаны аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи пертузумаба (SEQ ID No. 13 и 14, соответственно). CDR показаны жирным шрифтом. Рассчитанные молекулярные массы легкой цепи и тяжелой цепи составляют 23526,22 Да и 49216,56 Да (цистеины в восстановленной форме).

Углеводный остаток присоединен к Asn 299 тяжелой цепи.

На фиг.4 схематично изображено связывание 2C4 в сайте связывания HER2 в гетеродимере, таким образом, предотвращающее гетеродимеризацию с активированным EGFR или HER3.

На фиг.5 изображено сопряжение HER2/HER3 с путями MAPK и Akt.

На фиг.6 приведено сравнение различных активностей трастузумаба и пертузумаба.

На фиг.7A и 7B показаны аминокислотные последовательности легкой цепи трастузумаба (фиг.7A; SEQ ID No. 15) и тяжелой цепи трастузумаба (фиг.7B; SEQ ID No. 16), соответственно.

На фиг.8A и 8B изображена последовательность варианта легкой цепи пертузумаба (фиг.8A; SEQ ID No. 17) и последовательность варианта тяжелой цепи пертузумаба (фиг.8B; SEQ ID No. 18), соответственно.

Фиг.9A и 9B являются типичными профилями ФК-данных для одного субъекта, подогнанных с использованием однокамерной (фиг.9A) или двухкамерной (фиг.9B) модели. Не заштрихованные кружки показывают наблюдаемую концентрацию. Сплошная и пунктирная линии показывают рассчитанную для популяции и индивидуально рассчитанную концентрацию, соответственно.

На фиг.10A и 10B представлены смоделированные диагностические графики. На фиг.10A изображены наблюдаемые концентрации против рассчитанных концентраций. Сплошная линия представляет собой линию совпадения. На фиг.10B изображены взвешенные остатки против рассчитанных концентраций пертузумаба. Пунктирная линия представляет сглаживание данных с использованием функции LOESS.

На фиг.11A и 11B изображен случайный эффект (η) для зависимости клиренса (CL) от массы (WT) и объема в центральной камере (V_c) от площади поверхности тела (BSA) для базовой модели (фиг.11A) и конечной модели (фиг.11B).

На фиг.12A-F показана модельная оценка фармакокинетической популяционной модели для пертузумаба с использованием апостериорной проверки модели. Прогностическое апостериорное распределение и наблюдаемые значения статистики, лежащей в основе критерия: фиг.12A - 2,5-й; фиг.12B - 5-й; фиг.12C - 50-й, фиг.12D - 90-й, фиг.12E - 95-й, фиг.12F - 97,5-й перцентиль. Вертикальная линия на каждой гистограмме означает наблюдаемое значение статистики критерия.

На фиг.13 показана рассчитанная минимальная устойчивая концентрация пертузумаба (84 день) после введения фиксированной, основанной на массе (WT) или основанной на BSA дозы для 1000 моделируемых субъектов, вводимой бутстреп-методом из исходного набора фармакокинетических (ФК) данных согласно конечной модели.

На фиг.14A и 14B показана рассчитанная минимальная устойчивая концентрация пертузумаба (84 день) после введения фиксированной, основанной на массе (WT) или основанной на BSA дозы для популяций пациентов со значениями $WT \leq 10$ -му (50,4 кг) (фиг.14A) или ≥ 90 -му перцентилю (88,5 кг) (фиг.14B).

Подробное описание предпочтительных вариантов I Определения

«Фиксированная» или «единая» доза терапевтического средства в данном описании относится к дозе, которую вводят больному человеку независимо от массы (WT) или площади поверхности тела (BSA) пациента. Поэтому фиксированная или единая доза не приводится в виде дозы в мг/кг или в виде дозы в $\text{мг}/\text{м}^2$, а приводится в абсолютном количестве терапевтического средства.

«Ударная» доза в данном описании обычно включает начальную дозу

терапевтического средства, вводимого пациенту, и за ней следует одна или несколько поддерживающих доз терапевтического средства. Обычно вводят одну ударную дозу, но в данном случае рассматриваются и многократные ударные дозы. Обычно количество вводимой ударной дозы (доз) превышает количество вводимой поддерживающей дозы (доз), и/или ударную дозу (дозы) вводят чаще, чем поддерживающую дозу (дозы), так чтобы достичь требуемой устойчивой концентрации терапевтического средства раньше, чем ее можно достичь в случае поддерживающей дозы (доз).

«Поддерживающая» доза в данном описании относится к одной или нескольким дозам терапевтического средства, вводимого пациенту в течение периода лечения. Обычно поддерживающие дозы вводят с интервалами в лечении, такими как примерно через неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели или примерно через 4 недели.

«HER-рецептор» является рецепторной протеинтирозинкиназой, относится к семейству HER-рецепторов и включает рецепторы EGFR, HER2, HER3 и HER4. HER-рецептор как правило будет содержать внеклеточный домен, который может связывать лиганд HER и/или димеризоваться с другой молекулой HER-рецептора; липофильный трансмембранный домен; консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен и находящийся на карбоксильном конце домен передачи сигнала, несущий несколько остатков тирозина, которые могут быть фосфорилированы. HER-рецептор может представлять собой HER-рецептор с «нативной последовательностью» или с «вариантом аминокислотной последовательности». Предпочтительно HER-рецептор является HER-рецептором человека с нативной последовательностью.

Термины «ErbB1», «HER1», «рецептор эпидермального фактора роста» и «EGFR» используют в данном описании взаимозаменяемо, и они относятся к EGFR, который описан, например, в публикации Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), включая его встречающиеся в природе мутантные формы (например, делеционный мутант EGFR, который описан в публикации Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). erbB1 относится к гену, кодирующему белковый продукт EGFR.

Выражения «ErbB2» и «HER2» используют в данном описании взаимозаменяемо, и они относятся к белку HER2 человека, описанному, например, в публикациях Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985), и Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (номер доступа в Genebank X03363). Термин «erbB2» относится к гену, кодирующему ErbB2 человека, и «neu» относится к гену, кодирующему p185^{neu} крысы.

Предпочтительный HER2 представляет собой HER2 человека с нативной последовательностью.

Внеклеточный домен HER2 содержит четыре домена: «домен I» (аминокислотные остатки примерно от 1 до 195; SEQ ID NO:19), «домен II» (аминокислотные остатки примерно от 196 до 319; SEQ ID NO:20), «домен III» (аминокислотные остатки примерно от 320 до 488; SEQ ID NO:21) и «домен IV» (аминокислотные остатки примерно от 489 до 630; SEQ ID NO:22) (нумерация остатков без сигнального пептида). См. Garrett et al. Mol. Cell. 11:495-505 (2003), Cho et al. Nature 421:756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) и Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993), а также фиг.1 в данном описании.

«ErbB3» и «HER3» относятся к полипептиду рецептора, который описан, например, в патентах США №№5183884 и 5480968, а также Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989).

Термины «ErbB4» и «HER4» в данном описании относятся к полипептиду рецептора, который описан, например, в заявке на выдачу патента EP No 599274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); и Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993), включая его изоформы, которые описаны, например, в WO 99/19488,
 5 опубликованной 22 апреля 1999.

Под «лигандом HER» подразумевают полипептид, который связывается и/или активирует рецептор HER. Лиганд HER, представляющий особый интерес согласно настоящему изобретению, является лигандом HER человека с нативной
 10 последовательностью, таким как эпидермальный фактор роста (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)); амфирегулин, также известный как аутокринный фактор роста шванномы и кератиноцитов (Shoyab et al. Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al. Nature 348:257-260 (1990) и Cook et al. Mol. Cell. Biol. 11:2547-
 15 2557 (1991)); бетацеллюлин (Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); и Sasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)); эпирегулин (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); и Komurasaki et al. Oncogene 15:2841-2848 (1997)); херегулин (см. ниже); нейрегулин-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)); нейрегулин-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); нейрегулин-4 (NRG-4) (Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)) и крипто-(CR-1) (Kannan et al. J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)). Лиганды HER, которые связывают EGFR, включают EGF, TGF- α , амфирегулин, бетацеллюлин, HB-EGF и
 25 эпирегулин. Лиганды HER, которые связывают HER3, включают херегулины. Лиганды HER, способные связывать HER4, включают бетацеллюлин, эпирегулин, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 и херегулины.

«Херегулин» (HRG) при использовании в данном описании относится к
 30 полипептиду, кодируемому продуктом гена херегулина, который описан в патенте США №5641869 или Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993). Примеры херегулинов включают херегулин- α , херегулин- β 1, херегулин- β 2 и херегулин- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992), и патент США №5641869); фактор дифференцировки *leu* (NDF) (Peles et al. Cell 69:205-216 (1992)); активность, индуцирующую рецептор ацетилхолина (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); глиальные факторы роста (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); фактор, полученный из сенсорных нейронов и мотонейронов (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -херегулин (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)).

«Димер HER» в данном описании означает нековалентно связанный димер, содержащий по меньшей мере два HER-рецептора. Такие комплексы могут образовываться, когда на клетку, экспрессирующую два или более HER-рецепторов, воздействует лиганд HER, и они могут быть выделены иммунопреципитацией и проанализированы при помощи SDS-ПААГ, как описано, например, в
 45 публикации Sliwowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994). Примеры таких димеров HER включают гетеродимеры EGFR-HER2, HER2-HER3 и HER3-HER4. Кроме того, димер HER может содержать два или более HER2-рецепторов, объединенных с другим HER-рецептором, таким как HER3, HER4 или EGFR. С димером могут быть связаны другие белки, такие как субъединица рецептора цитокина (например, gp130).

«Ингибитор HER» представляет собой агент, который препятствует активации или функционированию HER. Примеры ингибиторов HER включают антитела к HER (например, антитела к EGFR, HER2, HER3 или HER4); направленные к EGFR

лекарственные средства; низкомолекулярные антагонисты HER; ингибиторы тирозинкиназы HER; двойные ингибиторы тирозинкиназы HER2 и EGFR, такие как лапатиниб/GW572016; антисмысловые молекулы (см., например, WO 2004/87207) и/или средства, которые связываются или мешают функционированию последующих

молекул в каскаде передачи сигнала, таких как MAPK или Akt (см. фиг.5). Предпочтительно ингибитором HER является антитело или малая молекула, которая связывается с рецептором HER.

«HER-антитело» является антителом, которое связывается с рецептором HER.

Необязательно, HER-антитело дополнительно препятствует активации или функционированию HER. Предпочтительно HER-антитело связывается с рецептором HER2. HER2-антителом, представляющим особый интерес согласно настоящему изобретению, является пертузумаб. Другим примером HER2-антитела является трастузумаб. Примеры EGFR-антител включают цетуксимаб и ABX0303.

«Активация HER» относится к активации или фосфорилированию любого одного или нескольких рецепторов HER. Как правило, активация HER приводит к трансдукции сигнала (например, трансдукции сигнала, вызванной внутриклеточным киназным доменом HER-рецептора, фосфорилирующим остатки тирозина в HER-рецепторе или полипептиде субстрата). Активация HER может быть опосредована связыванием лиганда HER с димером HER, содержащим представляющий интерес рецептор HER. Связывание лиганда HER с димером HER может активировать киназный домен одного или нескольких HER-рецепторов в димере и, тем самым, приводить к фосфорилированию остатков тирозина в одном или нескольких HER-рецепторах и/или к фосфорилированию остатков тирозина в дополнительных субстратных полипептидах, таких как внутриклеточные киназы Akt или MAPK. См., например, фиг.5.

«Фосфорилирование» относится к добавлению одной или нескольких фосфатных групп к белку, такому как HER-рецептор или его субстрат.

Антитело, которое «ингибирует димеризацию HER», представляет собой антитело, которое ингибирует или препятствует образованию димера HER. Предпочтительно такое антитело связывается с HER2 в его сайте связывания в гетеродимере. Наиболее предпочтительным ингибирующим димеризацию антителом согласно настоящему изобретению является пертузумаб или MAб 2C4. Связывание 2C4 с сайтом связывания HER2 в гетеродимере показано на фиг.4. Другие примеры антител, которые ингибируют димеризацию HER, включают антитела, которые связываются с EGFR и ингибируют его димеризацию с одним или несколькими другими HER-рецепторами (например, моноклональное EGFR-антитело 806, MAб 806, которое связывается с активированным или «несвязанным» EGFR; см. Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); антитела, которые связываются с HER3 и ингибируют его димеризацию с одним или несколькими другими HER-рецепторами; и антитела, которые связываются с HER4 и ингибируют его димеризацию с одним или несколькими другими HER-рецепторами.

Антитело, которое «ингибирует димеризацию HER более эффективно, чем трастузумаб», является антителом, которое уменьшает количество или устраняет димеры HER более эффективно (например, по меньшей мере примерно в 2 раза более эффективно), чем трастузумаб. Предпочтительно такое антитело ингибирует димеризацию HER2 по меньшей мере примерно так же эффективно, как антитело, выбранное из группы, состоящей из мышиного моноклонального антитела 2C4, Fab-фрагмента мышиного моноклонального антитела 2C4, пертузумаба и Fab-фрагмента

пертузумаба. Ингибирование димеризации HER можно оценить, исследуя димеры HER непосредственно или оценивая активацию HER или передачу сигнала ниже по течению, которая является результатом димеризации HER, и/или оценивая сайт связывания антитело-HER2 и т.д. Анализ для скрининга антител, обладающих способностью ингибировать димеризацию HER более эффективно, чем трастузумаб, описаны в публикации Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002) и WO 01/00245 (Adams et al.). Только в качестве примера можно провести анализ ингибирования димеризации HER, оценивая например ингибирование образования димеров HER (см., например, фиг.1А и В в Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002) и WO 01/00245); уменьшение активации лигандом HER клеток, которые экспрессируют димеры HER (например, WO 01/00245 и фиг.2А и В в Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)); блокирование связывания лиганда HER с клетками, которые экспрессируют димеры HER (например, WO 01/00245 и фиг.2Е в Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)); ингибирование клеточного роста раковых клеток (например, клеток MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D), которые экспрессируют димеры HER в присутствии (или в отсутствие) лиганда HER (например, WO 01/00245 и фиг.3А-Д в Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)); ингибирование передачи сигнала ниже по течению (например, ингибирование HRG-зависимого фосфорилирования АКТ или ингибирование HRG-или TGF α -зависимого фосфорилирования MAPK) (см., например, WO 01/00245 и фиг.2С и D в Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)). Также можно оценить, ингибирует ли антитело димеризацию HER, исследуя сайт связывания антитело-HER2, например, путем оценки структуры или модели, такой как кристаллическая структура, антитела, связанного с HER2 (см., например, Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

«Сайт связывания в гетеродимере» HER2 относится к области во внеклеточном домене HER2, которая контактирует или служит местом связывания с областью во внеклеточном домене EGFR, HER3 или HER4 при образовании с ними димера. Область обнаружена в домене II HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

HER2-антитело может «ингибировать HRG-зависимое фосфорилирование АКТ» и/или ингибировать «HRG- или TGF α -зависимое фосфорилирование MAPK» более эффективно (например, по меньшей мере в 2 раза более эффективно), чем трастузумаб (в качестве примера см. Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002) и WO 01/00245).

HER2-антитело может представлять собой антитело, которое «не ингибирует отщепление эктодомена HER2» (Molina et al. Cancer Res. 61:4744-4749(2001)).

HER2-антитело, которое «связывается с сайтом связывания в гетеродимере» HER2, связывается с остатками в домене II (и необязательно также связывается с остатками в других доменах внеклеточного домена HER2, таких как домены I и III) и может стерически затруднять, по меньшей мере в некоторой степени, образование гетеродимера HER2-EGFR, HER2-HER3 или HER2-HER4. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) охарактеризовали кристаллическую структуру HER2-пертузумаб, депонированную в RCSB Protein Data Bank (ID-код IS78), иллюстрируя типичное антитело, которое связывается с сайтом связывания HER2 в гетеродимере.

Антитело, которое «связывается с доменом II» HER2, связывается с остатками в домене II и необязательно с остатками в другом домене(ах) HER2, таких как домены I и III. Предпочтительно антитело, которое связывается с доменом II, связывается с местом соединения между доменами I, II и III HER2.

Полипептид с «нативной последовательностью» означает полипептид, который имеет такую же аминокислотную последовательность, как и полипептид (например,

HER-рецептор или лиганд HER), полученный из природного источника. Такие полипептиды с нативной последовательностью можно выделить из природного источника и можно получить способами рекомбинации или синтеза. Таким образом, полипептид с нативной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность встречающегося в природе полипептида человека, полипептида

мышь или полипептида любого другого вида млекопитающих.

Термин «антитело» в данном описании используют в самом широком смысле, и термин специально охватывает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность.

Термин «моноклональное антитело» в используемом в данном описании смысле относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп (эпитопы), за исключением возможных вариантов, которые могут возникать во время получения моноклонального антитела, такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. Такое моноклональное антитело обычно включает антитело, содержащее полипептидную

последовательность, которая связывает мишень, при этом связывающую мишень полипептидную последовательность получали способом, который заключается в отборе одной связывающей мишень полипептидной последовательности из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, например из пула клонов гибридом, фаговых клонов или клонов рекомбинантной ДНК. Следует понимать, что отобранная связывающая мишень последовательность может быть дополнительно изменена, например, чтобы улучшить аффинность по отношению к мишени, гуманизировать связывающую мишень последовательность, повысить ее продукцию в культуре клеток, уменьшить ее иммуногенность *in vivo*, создать полиспецифичное антитело и т.д., и что антитело, содержащее измененную связывающую мишень последовательность, также является моноклональным антителом согласно настоящему изобретению. Моноклональные антитела являются

высокоспецифичными, направленными против одного антигена. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Кроме своей специфичности, препараты моноклональных антител имеют преимущество, состоящее в том, что они обычно не содержат примесей других иммуноглобулинов. Определение «моноклональное» указывает на природу антитела как антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо

конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые согласно настоящему изобретению, могут быть получены разными способами, включая, например, способ на основе гибридом (например, Kohler et al., Nature 256:495 (1975), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), способы на основе рекомбинантной ДНК (см., например, патент США №4816567), методики, основанные на фаговом дисплее (см., например, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J.

Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al. J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)), и методики получения человеческих и подобных человеческим антител у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулинов человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); патенты США №№5545806, 5569825, 5591669 (все GenPharm); патент США №5545807; WO 1997/17852; патенты США №№5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016; Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)).

Моноклональные антитела в данном описании специально включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США №4816567 и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес согласно настоящему изобретению, включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, полученные от примата, отличного от человека (например, обезьяны Старого Света, человекообразные обезьяны и т.д.), и последовательности константной области человека.

«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, предпочтительно включающую в себя его антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; димерные антитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и полиспецифичные антитела, образованные из фрагмента(ов) антител.

«Интактное антитело» в данном описании означает антитело, которое содержит две антигенсвязывающие области и Fc-область. Предпочтительно интактное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей интактные антитела могут быть отнесены к разным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам антител, названы α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Эффекторные функции» антитела относятся к биологическим активностям, относящимся к Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплемент-зависимую

цитотоксичность; связывание рецептора Fc; зависимую от антител опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора, BCR) и т.д.

5 «Зависимая от антител опосредованная клетками цитотоксичность» и «ADCC» относятся к опосредованному клетками ответу, при котором неспецифичные цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. Первичные
10 клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Чтобы оценить активность в ADCC
15 представляющей интерес молекулы, можно осуществить анализы ADCC *in vitro*, такие как анализы, описанные в патентах США №№5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценить
20 *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно
25 клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют ADCC-эффекторную функцию. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительны PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из
30 их природного источника, например из крови или PBMC, как описано в данной публикации.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используют для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR,
35 который связывает IgG-антитело (гамма-рецептор), и к предпочтительным рецепторам относятся рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсируемые формы указанных рецепторов. Рецепторы FcγRIII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий
40 рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене основанный на тирозине мотив активации иммунорецептора (ITAM). Ингибирующий
45 рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене основанный на тирозине мотив ингибирования иммунорецептора (ITIM) (см. обзор в Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Обзор, посвященный FcR, представлен в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая FcR,
50 идентифицируемые в природе, включены в данном описании в термин «FcR». Термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976), и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом) в комплексе со своим антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента, можно осуществить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

«Нативные антитела» обычно являются гетеротетрамерными гликопротеидами с молекулярной массой примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как количество дисульфидных связей между тяжелыми цепями варьирует в разных изоформах иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует несколько константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на другом конце. Константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Полагают, что специфичные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин «переменный» относится к тому факту, что некоторые части переменных доменов в значительной степени отличаются по последовательности среди антител и используются в связывании и обеспечении специфичности каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. Однако переменность неравномерно распределена на протяжении переменных доменов антител. Она сконцентрирована в трех участках, называемых гиперпеременными областями, в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части переменных доменов называют каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию β -слоев, соединенных тремя гиперпеременными областями, которые образуют петли, связывающие и в некоторых случаях образующие часть бета-слоистой структуры. Гиперпеременные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и с гиперпеременными областями из другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в зависимой от антител опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC).

Термин «гиперпеременная область» при использовании в данном описании относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гиперпеременная область обычно содержит аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из «гиперпеременной петли» (например,

остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой другие остатки вариабельного домена, отличные от остатков

гипервариабельной области, которые определены в данном описании.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим участком, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает $F(ab')_2$ -фрагмент, который имеет два антигенсвязывающих участка и еще способен перекрестно связывать антиген.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок узнавания антигена и связывания антигена. Указанная область состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В указанной конфигурации взаимодействуют три гипервариабельные области каждого вариабельного домена, определяя антигенсвязывающий участок на поверхности димера V_H - V_L . Вместе шесть гипервариабельных областей придают антителу специфичность в связывании антигена. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три гипервариабельные области, специфичные по отношению к антигену) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный связывающий участок.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном описании является обозначением Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несут по меньшей мере одну свободную тиольную группу. $F(ab')_2$ -фрагменты антитела обычно получают в виде пары Fab'-фрагментов, между которыми имеются цистеины шарнирной области. Также известны другие типы химического связывания фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух явно отличающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей из константных доменов.

«Одноцепочечные Fv» или «scFv» фрагменты антител содержат домены V_H и V_L антитела, где указанные домены присутствуют в одной полипептидной цепи.

Предпочтительно полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Обзор scFv см. у Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994). scFv-фрагменты HER2-антител описаны в WO 93/16185; патенте США №5571894 и патенте США №5587458.

Термин «димерные антитела» относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, и такие фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L). Благодаря использованию линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить возможность спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих

участка. Димерные антитела более полно описаны например в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

«Гуманизированные» формы антител животных, отличных от человека (например, грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина животного, отличного от человека. Главным образом, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающей требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками животного, отличного от человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Такие модификации осуществляют для того, чтобы дополнительно улучшить эффективность антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать в основном целиком по меньшей мере один и обычно два вариабельных домена, в которых все или в основном все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина животного, отличного от человека, и все или в основном все FR являются FR из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константной области иммуноглобулина человека. Более подробное описание см. в Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988), и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Гуманизированные HER2-антитела включают huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 или трастузумаб (HERCEPTIN®), которые описаны в таблице 3 патента США №5821337, специально включенного в данное описание в виде ссылки; гуманизированное антитело 520C9 (WO 93/21319) и гуманизированное антитело 2C4, которое описано в данной публикации.

В целях настоящего описания «трастузумаб», «HERCEPTIN®» и «huMAb4D5-8» относятся к антителу, содержащему аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи SEQ ID No. 15 и 16, соответственно.

В данном описании «пертузумаб» и «OMNITARG™» относятся к антителу, содержащему аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи SEQ ID No. 13 и 14, соответственно.

Различия между функциями трастузумаба и пертузумаба показаны на фиг.6.

«Голое антитело» означает антитело, которое не конъюгировано с гетерологичной молекулой, такой как цитотоксический остаток или радиоактивная метка.

«Изолированным» антителом является антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонентов его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются вещества, которые могут мешать диагностическим или терапевтическим применениям антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах антитело будет очищено (1) в степени, составляющей более чем 95% мас. антитела, которую определяют способом Лоури, и наиболее предпочтительно более чем 99% мас., (2) в такой степени, которая достаточна для

получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся цилиндром, или (3) до гомогенности при SDS-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окраски Кумасси синим или предпочтительно серебром. Изолированное антитело включает антитело, находящееся *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент природной среды антитела не будет присутствовать. Однако обычно изолированное антитело будет получено по меньшей мере с помощью одной стадии очистки.

«Аффинно созревшее» антитело представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его гипервариабельных областях, которые приводят к улучшению аффинности антитела по отношению к антигену по сравнению с исходным антителом, которое не имеет такого изменения(ий).

Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности по отношению к антигену-мишени. Аффинно созревшие антитела получают способами, известными в данной области. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывают созревание аффинности посредством перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркаса описан в: Barbas et al. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Термин «антитело основного типа» в данном описании относится к структуре антитела в композиции, которое является количественно преобладающей молекулой антитела в композиции. В одном варианте антителом основного типа является HER2-антитело, такое как антитело, которое связывается с доменом II HER2, антитело, которое ингибирует димеризацию HER более эффективно, чем трастузумаб, и/или антитело, которое связывается с сайтом связывания HER2 в гетеродимере.

Предпочтительным согласно настоящему изобретению антителом основного типа является антитело, содержащее аминокислотные последовательности вариабельного домена легкой цепи и вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID No. 3 и 4 и наиболее предпочтительно содержащее аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи SEQ ID No. 13 и 14 (пертузумаб).

Антитело с «вариантом аминокислотной последовательности» в данном описании означает антитело с аминокислотной последовательностью, которая отличается от антитела основного типа. Обычно варианты аминокислотной последовательности будут иметь по меньшей мере примерно 70% гомологию с антителом основного типа, и предпочтительно они будут по меньшей мере примерно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90% гомологичными антителу основного типа. Варианты аминокислотной последовательности имеют замены, делеции и/или добавления в некоторых положениях в аминокислотной последовательности антитела основного типа или примыкающие к ней. Примеры вариантов аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению включают кислые варианты (например, дезаминированный вариант антитела), основной вариант, антитело с удлинением в виде аминоконцевого лидера (например, VHS-) на одной или двух его легких цепях, антитело с C-концевым остатком лизина на одной или двух его тяжелых цепях и т.д. и включают комбинации вариантов аминокислотных последовательностей тяжелых и/или легких цепей. Вариантом антитела, представляющим особый интерес согласно настоящему изобретению,

является антитело, содержащее удлинение в виде аминоконцевого лидера на одной или двух его легких цепях, необязательно дополнительно содержащее другие отличия в аминокислотной последовательности и/или гликозилировании по сравнению с антителом основного типа.

Антитело с «вариантом гликозилирования» в данном описании означает антитело с одним или несколькими связанными с ним углеводными остатками, которые отличаются от одного или нескольких углеводных остатков, связанных с антителом основного типа. Примеры вариантов гликозилирования согласно изобретению включают антитело с G1- или G2-олигосахаридной структурой вместо G0-олигосахаридной структуры, связанной с его Fc-областью, антитело с одним или двумя углеводными остатками, связанными с одной или двумя легкими цепями, антитело, не содержащее углевода, связанного с одной или двумя тяжелыми цепями антитела, и т.д. и комбинации изменений гликозилирования.

В том случае, когда антитело имеет Fc-область, олигосахаридная структура, такая как структура, показанная на фиг.9 в данном описании, может быть связана с одной или двумя тяжелыми цепями антитела, например у остатка 299 (298, Eu-нумерация остатков). В случае пертузумаба преобладающей олигосахаридной структурой была структура G0, при этом другие олигосахаридные структуры, такие как G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) и G2, обнаружены в меньших количествах в композиции пертузумаба.

Если не оговорено особо, «олигосахаридная структура G1» в данном описании включает структуры G-1, G1-1, G1(1-6) и G1(1-3).

«Удлинение в виде аминоконцевого лидера» в данном описании относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам аминоконцевой лидерной последовательности, которые присутствуют на аминоконце любой одной или нескольких тяжелых или легких цепей антитела. Типичное удлинение в виде аминоконцевого лидера содержит или состоит из трех аминокислотных остатков, VHS, присутствующих на одной или обеих легких цепях варианта антитела.

«Дезаминированное» антитело представляет собой антитело, в котором один или несколько остатков аспарагина дериватизованы, например, до аспарагиновой кислоты, сукцинимиды или изо-аспарагиновой кислоты.

Термины «злокачественная опухоль» и «злокачественный» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры злокачественной опухоли включают, без ограничения, карциному, лимфому, бластому (включая медуллобластому и ретинобластому), саркому (включая липосаркому и саркому синовиальных клеток), нейроэндокринные опухоли (включая карциноидные опухоли, гастриному и рак островковых клеток), мезотелиому, шванному (включая акустическую нейрому), менингиому, аденокарциному, меланому и лейкоз или лимфоидные злокачественные образования. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают рак сквамозных клеток (например рак клеток сквамозного эпителия), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоклеточный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы (включая метастатический рак молочной железы), рак ободочной кишки, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, эндометриальную карциному или

карциному матки, карциному слюнных желез, рак почек, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному заднего прохода, карциному пениса, рак семенников, рак пищевода, опухоли желчных путей, а также рак головы и шеи.

В данном описании «пациент» означает больного человека. Пациент может быть «пациентом со злокачественной опухолью», т.е. пациентом, который страдает или для которого существует риск испытать один или несколько симптомов злокачественной опухоли, или другим пациентом, который может получить пользу от лечения HER-антителом.

«Биологический образец» относится к образцу, как правило, клеткам или ткани, полученной из биологического источника.

«Образец от пациента» относится к образцу, полученному от пациента, такого как пациент со злокачественной опухолью.

«Образец опухоли» в данном описании означает образец, полученный или содержащий опухолевые клетки из опухоли пациента. Примеры образцов опухолей согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, биопсии опухолей, циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие белки плазмы, асцитную жидкость, первичные культуры клеток или линии клеток, полученные из опухолей или проявляющие свойства, подобные свойствам опухолей, а также фиксированные образцы опухолей, такие как образцы опухолей, фиксированные в формалине, залитые в парафин или замороженные образцы опухолей.

«Фиксированный» образец опухоли означает образец, который был гистологически фиксирован с использованием фиксатора.

«Фиксированный в формалине» образец опухоли представляет собой образец, который был фиксирован с использованием формальдегида в качестве фиксатора.

«Залитый» образец опухоли представляет собой образец, окруженный плотной и, как правило, твердой средой, такой как парафин, воск, целлоидин или смола. Заливка делает возможным получение тонких срезов для микроскопического исследования или для создания микрочипов ткани (ТМА).

«Залитый в парафин» образец опухоли представляет собой образец, окруженный очищенной смесью твердых углеводов, полученных из нефти.

В данном описании «замороженный» образец опухоли относится к образцу опухоли, который заморожен или был заморожен.

Образцом злокачественной опухоли или биологическим образцом, в котором «наблюдается экспрессия, амплификация или активация HER», является образец, который в диагностическом тесте экспрессирует (включая сверхэкспрессию) рецептор HER, имеет амплифицированный ген HER и/или в котором иным образом проявляется активация или фосфорилирование рецептора HER. Такую активацию можно определить непосредственно (например, посредством измерения фосфорилирования HER) или опосредованно (например, по профилю экспрессии генов или определяя гетеродимеры HER, как описано в данной публикации).

Злокачественная опухоль со «сверхэкспрессией или амплификацией рецептора HER» представляет собой злокачественную опухоль, которая имеет значительно более высокие уровни белка или гена рецептора HER по сравнению с незлокачественной клеткой такого же типа ткани. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Сверхэкспрессию или амплификацию рецептора HER можно определить в диагностическом или прогностическом анализе посредством оценки повышенных

уровней белка HER, присутствующего на поверхности клетки (например, с использованием иммуногистохимического анализа; ИНС). Альтернативно или дополнительно, можно измерить уровни кодирующей HER нуклеиновой кислоты в клетке, например, способами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; см. WO 98/45479, опубликованную в октябре 1998), Саузерн-блоттинга или полимеразной цепной реакции (ПЦР), такой как количественная ПЦР в режиме реального времени (qRT-ПЦР). Также можно исследовать сверхэкспрессию или амплификацию рецептора HER измерением «слушиваемого» антигена (например, внеклеточного домена HER) в биологической жидкости, такой как сыворотка (см., например, патент США №4933294, опубликованный 12 июня 1990; WO 91/05264, опубликованную 18 апреля 1991; патент США №5401638, опубликованный 28 марта 1995; и Sias et al. J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). За исключением указанных выше анализов, специалисту доступны различные анализы *in vivo*. Например, можно подвергнуть клетки в организме пациента воздействию антитела, которое необязательно метят регистрируемой меткой, например радиоактивным изотопом, и можно оценить у пациента связывание антитела с клетками, например, внешним сканированием радиоактивности или анализом биопсии, взятой у пациента, предварительно подвергнутого воздействию антитела.

Наоборот, злокачественная опухоль, которая «не сверхэкспрессирует или не амплифицирует рецептор HER», представляет собой злокачественную опухоль, которая не имеет более высоких, чем нормальные, уровни белка или гена рецептора HER по сравнению с незлокачественной клеткой того же типа ткани. Антитела, которые ингибируют димеризацию HER, такие как пертузумаб, можно использовать для лечения злокачественной опухоли, которая не сверхэкспрессирует или не амплифицирует рецептор HER2.

«Ингибирующее рост средство» при использовании в данном описании относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки, в частности злокачественной клетки, экспрессирующей HER либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, ингибирующим рост средством может быть средство, которое в значительной степени уменьшает процентное содержание клеток, сверхэкспрессирующих HER, в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, которые блокируют прохождение клеточного цикла (в другом месте, отличном от S-фазы), такие как средства, которые индуцируют задержку в G1-фазе и задержку в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Средства, которые задерживают в G1, также распространяют свое действие на задержку в S-фазе, например ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, озаглавленной «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особенно на стр. 13.

Примерами «ингибирующих рост» антител являются антитела, которые связываются с HER2 и ингибируют рост злокачественных клеток, сверхэкспрессирующих HER2. Предпочтительные ингибирующие рост HER2-антител ингибируют рост клеток опухоли молочной железы SK-BR-3 в культуре клеток более чем на 20% и предпочтительно более чем на 50% (например, примерно от 50% до примерно 100%) при концентрации антитела примерно от 0,5 до 30 мкг/мл, при этом

ингибирование роста определяют через шесть суток после воздействия на клетки SK-BR-3 антителом (см. патент США №5677171, опубликованный 14 октября 1997).

Анализ ингибирования роста клеток SK-BR-3 более подробно описан в указанном патенте и в данном описании ниже. Предпочтительным ингибирующим рост
 5 антителом является гуманизированный вариант мышинового моноклонального антитела 4D5, например трастузумаб.

Антителом, которое «индуцирует апоптоз», является антитело, которое индуцирует запрограммированную гибель клеток, которую определяют по связыванию
 10 аннексина V, фрагментации ДНК, сморщиванию клеток, расширению эндоплазматического ретикулума, фрагментации клеток и/или образованию мембранных пузырьков (называемых апоптозными тельцами). Клеткой обычно является клетка, которая сверхэкспрессирует рецептор HER2. Предпочтительно клетка является опухолевой клеткой, например клеткой молочной железы, яичника, желудка,
 15 эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, ободочной кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или мочевого пузыря. *In vitro* клетка может представлять собой клетку SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 или SKOV3.

Имеются различные способы оценки клеточных событий, связанных с апоптозом.

Например, транслокацию фосфатидилсерина (PS) можно измерить по связыванию аннексина; фрагментацию ДНК можно оценить, получая при электрофоретическом разделении ДНК-лэддер; и конденсацию ядер/хроматина наряду с фрагментацией ДНК можно оценить по любому увеличению количеств гиподиплоидных клеток.

Предпочтительно антителом, которое индуцирует апоптоз, является антитело,
 25 которое приводит примерно к 2-50-кратной, предпочтительно примерно 5-50-кратной и наиболее предпочтительно примерно 10-50-кратной индукции связывания аннексина по сравнению с необработанной клеткой в анализе связывания аннексина с использованием клеток BT474 (см. ниже). Примерами HER2-антител, которые
 30 индуцируют апоптоз, являются 7C2 и 7F3.

«Эпитоп 2C4» представляет собой область внеклеточного домена HER2, с которой связывается антитело 2C4. Чтобы провести скрининг в отношении антител, которые связываются с эпитопом 2C4, можно осуществить общепринятый анализ
 35 перекрестного блокирования, такой как анализ, описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Предпочтительно антитело блокирует связывание 2C4 с HER2 примерно на 50% или более.

Альтернативно, можно осуществить картирование эпитопов, чтобы оценить, связывается ли антитело с эпитопом 2C4 HER2. Эпитоп 2C4 содержит остатки из
 40 домена II внеклеточного домена HER2. 2C4 и пертузумаб связываются с внеклеточным доменом HER2 в месте соединения доменов I, II и III. Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

«Эпитоп 4D5» представляет собой область внеклеточного домена HER2, с которой связываются антитело 4D5 (ATCC CRL 10463) и трастузумаб. Указанный эпитоп
 45 расположен вблизи трансмембранного домена HER2 и в домене IV HER2. Чтобы провести скрининг в отношении антител, которые связываются с эпитопом 4D5, можно осуществить общепринятый анализ перекрестного блокирования, такой как анализ, описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed
 50 Harlow and David Lane (1988). Альтернативно, можно осуществить картирование эпитопов, чтобы оценить, связывается ли антитело с эпитопом 4D5 HER2 (например, с любым одним или несколькими остатками в области примерно от остатка 529 до остатка 625, включающей ECD HER2, нумерация остатков с включением сигнального

пептида).

«Эпитоп 7C2/7F3» представляет собой область на N-конце, в домене I, внеклеточного домена HER2, с которой связываются антитела 7C2 и/или 7F3 (каждое из которых депонировано в ATCC, см. ниже). Чтобы провести скрининг в отношении антител, которые связываются с эпитопом 7C2/7F3, можно осуществить общепринятый анализ перекрестного блокирования, такой как анализ, описанный в Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Альтернативно, можно осуществить картирование эпитопов, чтобы установить, связывается ли антитело с эпитопом 7C2/7F3 на HER2 (например, любым одним или несколькими остатками в области примерно от остатка 22 до остатка 53 ECD HER2, нумерация остатков с включением сигнального пептида).

«Лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. К субъектам, нуждающимся в лечении, относятся субъекты, уже имеющие заболевание, а также субъекты, у которых необходимо предотвратить расстройство. Поэтому у пациента, которого необходимо лечить согласно настоящему изобретению, может быть диагностировано наличие заболевания или он может быть предрасположен или чувствителен к заболеванию.

Термин «эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, эффективному при лечении злокачественной опухоли у пациента. Эффективное количество лекарственного средства может уменьшать количество злокачественных клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно останавливать) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно останавливать) опухолевые метастазы; в определенной степени ингибировать рост опухоли и/или в определенной степени ослаблять один или несколько симптомов, связанных со злокачественной опухолью. В зависимости от степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие злокачественные клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Эффективное количество может продлевать выживаемость без прогрессирования (например, измеряемую по критериям оценки ответа для солидных опухолей, RECIST, или изменениям CA-125), приводить к объективному ответу (включая частичный ответ, PR, или полный ответ, CR), увеличивать общую продолжительность выживания и/или ослабить один или несколько симптомов злокачественной опухоли (например, оцениваемых с использованием FOSI).

«Общая выживаемость» относится к пациенту, который остается живым в течение определенного периода времени, например 1 год, 5 лет и т.д., например, считая с момента постановки диагноза или лечения.

«Выживаемость без прогрессирования» относится к пациенту, который остается живым без ухудшения состояния злокачественной опухоли. «Объективный ответ» относится к измеряемому ответу, включая полный ответ (CR) или частичный ответ (PR).

Под «полным ответом» или «полной ремиссией» подразумевают исчезновение всех признаков злокачественной опухоли в ответ на лечение. Это не всегда означает излечение злокачественной опухоли.

«Частичный ответ» относится к уменьшению размера одной или нескольких опухолей или повреждений или степени злокачественной опухоли в организме в ответ на лечение.

Термин «цитотоксическое средство» в используемом в данном описании смысле относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, имеющие происхождение из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты.

«Химиотерапевтическим средством» является химическое соединение, применимое для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; TLK 286 (TELCYTA®); ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; бифосфонаты, такие как клодронат; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)) и антрациклины, такие как аннамицин, AD 32, алкарубицин, даунорубицин, декстразоксан, DX-52-1, эпирубицин, GPX-100; идарубицин, KRN5500, меногарил, динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеинов - энединовые антибиотики, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMICIN® (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, липосомальный доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эзорубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан и

тестолактон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан и трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота (лейковорин); ацеглатон; антифолатные антинеопластические средства, такие как ALIMTA®, LY231514, пеметрексед, ингибиторы

5 диidroфолатредуктазы, такие как метотрексат, антиметаболиты, такие как 5-фторурацил (5-FU) и его пролекарства, такие как UFT, S-1 и капецитабин, и ингибиторы тимидилатсинтазы и ингибиторы

глицинамидрибонуклеотидформилтрансферазы, такие как ралтитрексед

10 (TOMUDEX^{RM}, TDX); ингибиторы диidroпиримидиндегидрогеназы, такие как энилурацил; гликозид альдофосфамид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дуфофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; мейтанзиноиды, такие как мейтанзин и ансамитоцины; митогуазон;

15 митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триакивон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, рорицин А и ангиудин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды и таксаны, например паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), не содержащий кремофора ABRAXANETM, препарат паклитаксела на

25 основе сконструированных, связанных с альбумином наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), и доксетаксел TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; платину; аналоги платины или основанные на платине аналоги, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкрестин (ONCOVIN®); алкалоид барвинка; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000;

30 диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого агента, указанного выше; а также комбинации двух или более указанных выше средств, такие как СНОР, сокращенное название комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкрестином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращенное название

40 схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Также в указанное определение включены противогормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен,

45 дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен FARESTON®; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, ацетат мегестрола MEGASE®,

50 эксместан AROMASIN®, форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастрозол ARIMIDEX®; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые

олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в пролиферацию аберрантных клеток, таких как например PKC-альфа, Raf, H-Ras, и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например
 5 вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; gmRH ABARELIX® и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств.

10 «Антиметаболитным химиотерапевтическим средством» является средство, которое структурно сходно с метаболитом, но не может быть использовано организмом продуктивным образом. Многие антиметаболитные химиотерапевтические средства препятствуют продуцированию нуклеиновых кислот, РНК и ДНК. Примеры антиметаболитных химиотерапевтических средств включают гемцитабин
 15 (GEMZAR®), 5-фторурацил (5-FU), капецитабин (XELODA™), 6-меркаптопурин, метотрексат, 6-тиогуанин, пеметрексед, ралтитрексед, арабинозилцитозин ARA-C цитарабин (CYTOSAR-U®), дакарбазин (DTIC-DOME®), азоцитозин, дезоксицитозин, пириимидин, флударабин (FLUDARA®), кладрабин, 2-дезоксид-D-глюкозу и т.д.

20 Предпочтительным антиметаболитным химиотерапевтическим средством является гемцитабин.

«Гемцитабин» или «моногидрохлорид 2'-дезоксид-2',2'-дифторцитидина (b-изомер)» является нуклеозидным аналогом, который проявляет противоопухолевую активность. Эмпирической формулой гемцитабина·HCl является C₉H₁₁F₂N₃O₄·HCl.
 25 Гемцитабин·HCl продается Eli Lilly под торговой маркой GEMZAR®.

«Основанное на платине химиотерапевтическое средство» включает органическое соединение, которое содержит платину в качестве составной части молекулы. Примеры основанных на платине химиотерапевтических средств включают
 30 карбоплатин, цисплатин и оксалиплатину.

Под «основанной на платине химиотерапией» подразумевают терапию одним или несколькими основанными на платине химиотерапевтическими средствами, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими химиотерапевтическими средствами.

35 Под «резистентной к платине» злокачественной опухолью подразумевают, что злокачественная опухоль пациента прогрессирует несмотря на получение основанной на платине химиотерапии (т.е. пациент является «невосприимчивым к платине») или заболевание пациента прогрессирует в течение 12 месяцев (например, в течение 6
 40 месяцев) после завершения основанной на платине схемы химиотерапии.

«Антиангиогенное средство» относится к соединению, которое блокирует или в некоторой степени препятствует развитию кровеносных сосудов. Антиангиогенным фактором может быть, например, малая молекула или антитело, которое связывается с фактором роста или рецептором фактора роста, вовлеченным в стимуляцию
 45 ангиогенеза. Предпочтительным антиангиогенным фактором согласно изобретению является антитело, которое связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), такое как бевацизумаб (AVASTIN®).

Термин «цитокин» является родовым названием белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. К цитокинам относится гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метионил-гормон роста человека и бычий гормон

роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин;
 прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий
 гормон (ФСГ), тироидстимулирующий гормон (тиреотропин (ТСГ)) и
 лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста гепатоцитов; фактор роста
 фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор- α и - β некроза опухолей;
 мюллерова ингибирующая субстанция; мышинный ассоциированный с
 гонадотропином пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелиальных клеток
 сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТРО); факторы роста нервов, такие как NGF- β ;
 фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-
 α и TGF- β ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (ЕРО);
 остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ,
 колониестимулирующие факторы (CSF), такие как CSF макрофагов (M-CSF), CSF
 гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и CSF гранулоцитов (G-CSF);
 интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9,
 IL-10, IL-11, IL-12, фактор некроза опухоли, такой как TNF- α или TNF- β ; и другие
 полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). Как используется в данном
 описании, термин цитокин включает белки из природных источников или из культуры
 рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной
 последовательностью.

Как используется в данном описании, термин «направленное к EGFR лекарственное
 средство» относится к терапевтическому средству, которое связывается с EGFR и,
 необязательно, ингибирует активацию EGFR. Примеры таких средств включают
 антитела и малые молекулы, которые связываются с EGFR. Примеры антител,
 которые связываются с EGFR, включают MAб 579 (ATCC CRL HB 8506), MAб 455
 (ATCC CRL HB8507), MAб 225 (ATCC CRL 8508), MAб 528 (ATCC CRL 8509) (см. патент
 США №4943533, Mendelsohn et al.) и их варианты, такие как химерное антитело 225
 (C225 или цетуксимаб; ERBUTIX®) и реконструированное антитело 225
 человека (H225) (см. WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); антитела, которые связывают
 мутант EGFR типа II (патент США №5212290); гуманизированные и химерные
 антитела, которые связывают EGFR, как описано в патенте США №5891996; и
 человеческие антитела, которые связывают EGFR, такие как ABX-EGF (см. WO
 98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)) и mAb
 806 или гуманизированное mAb 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384
 (2004)). Анти-EGFR-антитело может быть конъюгировано с цитотоксическим
 средством, образуя, таким образом, иммуноконъюгат (см., например, EP 659439A2,
 Merck Patent GmbH). Примеры малых молекул, которые связываются с EGFR,
 включают ZD1839 или гефитиниб (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 или
 эрлотиниб·HCl (TARCEVA™; Genentech/OSI) и AG 1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

«Ингибитор тирозинкиназы» означает молекулу, которая ингибирует
 тирозинкиназную активность тирозинкиназы, например рецептор HER. Примеры
 таких ингибиторов включают направленные к EGFR лекарственные средства,
 указанные в предыдущем абзаце; низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы HER2,
 такой как TAK165, доступный от Takeda; двойные ингибиторы HER, такие как ЕКВ-
 569 (доступный от Wyeth), который предпочтительно связывает EGFR, но ингибирует
 как HER2, так и EGFR-сверхэкспрессирующие клетки; GW572016 (доступный от Glaxo),
 пероральный ингибитор тирозинкиназы HER2 и EGFR; PKI-166 (доступный
 от Novartis); пан-HER-ингибиторы, такие как канетиниб (CI-1033; Pharmacia);
 ингибиторы Raf-1, такие как антисмысловой агент ISIS-5132, доступный от ISIS

Pharmaceuticals, который ингибирует передачу сигнала Raf-1; не направленные к HER ингибиторы ТК, такие как мезилат иматиниба (Gleevac™), доступный от Glaxo; ингибитор регулируемой внеклеточными сигналами MAPK-киназы 1 CI-1040 (доступный от Pharmacia); хиназолины, такие как PD 153035, 4-(3-хлоранилино)хиназолин; пиридопиримидины; пиримидопиримидины; пирролопиримидины, такие как CGP 59326, CGP 60261 и CGP 62706; пиразолопиримидины, 4-(фениламино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидины; куркумин (диферулоилметан, 4,5-бис(4-фторанилино)фталимид); тирфостины, содержащие остатки нитротиофена; PD-0183805 (Warner-Lambert); антисмысловые молекулы (например, молекулы, которые связываются с нуклеиновой кислотой, кодирующей HER); хиноксалины (патент США №5804396); трифостины (патент США №5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); пан-HER-ингибиторы, такие как CI-1033 (Pfizer); аффинитак (ISIS 3521; Isis/Lilly); мезилат иматиниба (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); семаксиниб (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); или средства, описанные в любой из следующих патентных публикаций: патент США №5804396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca) и WO 96/33980 (Zeneca).

«Аутоиммунное заболевание» согласно изобретению представляет собой заболевание или расстройство, возникающее и направленное против собственных тканей индивидуума, или ассоциированное с ним заболевание, или его проявление, или возникающее при этом состояние. Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают, без ограничения, артрит (ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагрический артрит, острый подагрический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, вертебральный артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессивный артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит и анкилозирующий спондилит), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопию, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетиформный дерматит и атопический дерматит; X-сцепленный синдром гипер-IgM, крапивницу, такую как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермический некролиз, склеродерму (включая системную склеродерму), склероз, такой как системный склероз, рассеянный склероз (MS), такой как MS с поражением спинного мозга и зрительного нерва, первичный прогрессирующий MS (PPMS) и релапсирующий ремиттирующий MS (PPMS), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, диссеминирующий склероз и атаксический склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, опосредованные аутоиммунными реакциями желудочно-кишечные заболевания, колит, такой как язвенный колит, colitis ulcerosa, микроскопический колит,

коллагеновый колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), гангренозную пиодерму, узловатую эритему, первичный склерозирующий холангит, эписклерит, респираторный дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глазного яблока, ирит, хориоидит, аутоиммунное гематологическое расстройство, ревматоидный спондилит, внезапную потерю слуха, IgE-опосредованные заболевания, такие как анафилаксия и

10 аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит и/или энцефалит ствола головного мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантгенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит,

15 гломерулонефрит (GN) с нефротическим или без нефротического синдрома, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный GN, иммунно-опосредованный GN, мембранный GN (мембранная нефропатия), идиопатический мембранный GN или идиопатическая мембранная нефропатия, мембрано-пролиферативный или мембранный пролиферативный GN (MPGN), включая тип I и

20 тип II, и быстро прогрессирующий GN, аллергические состояния и реакции, экзему, включая аллергическую или атопическую экзему, астму, такую как asthma bronchiale, бронхиальная астма и аутоиммунная астма, состояния, в которые вовлечена инфильтрация Т-клеток и хронические воспалительные реакции, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как группы крови А-В-О, во время

25 беременности, хроническое воспалительное заболевание легких, аутоиммунный миокардит, недостаточность адгезии лейкоцитов, системную красную волчанку (СКВ), такую как кожная СКВ, подострая кожная системная красная волчанка, неонатальный волчаночный синдром (NLE), диссеминированная красная волчанка,

30 волчанку (включая нефрит, церебрит, волчанку в детском возрасте, непечечную, внепечечную, дискоидную, алопецию), юношеский сахарный диабет (типа I), включая инсулинозависимый сахарный диабет у детей (IDDM), сахарный диабет у взрослых (диабет типа II), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью,

35 опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулитиды, включая васкулит (включая васкулит крупных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (артериит Такаясу)),

40 васкулит средних сосудов (включая болезнь Кавасаки и нодозный полиартериит/нодозный периартерит), микроскопический полиартерит, васкулит ЦНС, некротизирующий, кожный или гиперчувствительный васкулит, системный некротизирующий васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Чарга-Стросса (CSS)), темпоральный артериит, апластическую анемию,

45 аутоиммунную апластическую анемию, Кумбс-позитивную анемию, анемию Дамонда-Блэкфена, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), пернициозную анемию (anemia perniosa), Аддисонову болезнь, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), недостаточность фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную

50 нейтропению, панцитопению, лейкопению, заболевания, в которые вовлечен диапедез лейкоцитов, воспалительные заболевания ЦНС, синдром множественного органного повреждения, такой как вторичные синдромы при септицемии, травме или геморрагии,

заболевания, опосредованные комплексами антиген-антитело, заболевание, вызванное антителами к клубочковой базальной мембране, синдром антифосфолипидных антител, аллергический неврит, болезнь Бехчета, синдром Кастлемана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и кожный пемфигоид, пемфигус (включая вульгарный пемфигус, листовидный пемфигус, пемфигоид слизистой оболочки и эриматозный пемфигус), аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, иммунокомплексный нефрит, опосредованный антителами нефрит, оптический нейромиеелит, полиневропатии, хроническую невропатию, такую как IgM-полиневропатии или опосредованная IgM невропатия, тромбоцитопению (которая развивается, например, у пациентов с инфарктом миокарда), включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), посттрансфузионную пурпуру (РТР), индуцированную гепарином тромбоцитопению и аутоиммунную или опосредованную иммунитетом тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТР), включая хроническую и острую ИТР, аутоиммунное заболевание семенников и яичника, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреозидизм, гипопаратиреозидизм, аутоиммунные эндокринные заболевания, включая аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреозидизм, болезнь Граве (диффузный токсический зоб), полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные полигландулярные синдромы (или полигландулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, включая неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром обездвиженности «stiff-man»-синдром или «stiff-person»-синдром, энцефаломиеелит, такой как аллергический энцефаломиеелит или encephalomyelitis allergica и экспериментальный аллергический энцефаломиеелит (ЕАЕ), бульбоспинальный паралич, такой как связанный с тимомой бульбоспинальный паралич, дегенерацию мозжечка, нейромиеотонию, синдром опсоклонуса или синдром опсоклонуса-миоклонуса (OMS) и сенсорную невропатию, многофокальную моторную невропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, липоидный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (LIP), облитерирующий бронхиолит (не трансплантационный) вариант NSIP, синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA-зависимый дерматоз, первичный билиарный цирроз, цирроз легких, синдром аутоиммунной энтеропатии, целиакию, глютенную болезнь, брюшной спру (глютенная энтеропатия), рефрактерный спру, идиопатический спру, криоглобулинемию, боковой амиотрофический склероз (ALS; болезнь Лу Герига), болезнь коронарных артерий, аутоиммунное заболевание уха, такое как аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунная потеря слуха, синдром опсоклонус-миоклонус (OMS), полихондрит, такой как рефрактерный или рецидивирующий полихондрит, легочный альвеолярный протеиноз, амилоидоз, склерит, незлокачественный лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественная моноклональная гаммопатия и моноклональная гаммопатия неопределенного значения, MGUS), периферическую невропатию, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия,

мигрень, аритмия, мышечные нарушения, глухота, слепота, периодический паралич и
 каналопатии ЦНС; аутизм, воспалительную миопатию, фокальный сегментарный
 гломерулосклероз (FSGS), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит,
 аутоиммунный гепатит, фибромиалгию, множественную эндокринную
 5 недостаточность, синдром Шмидта, адреналит, атрофию желудка, пресенильную
 деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные
 демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая
 полиневропатия, диабетическую невропатию, синдром Дресслера, гнездную
 10 алопецию, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики
 пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия), аутоиммунное бесплодие у мужчин и
 женщин, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Шагаса, ревматизм,
 привычный выкидыш, аллергический альвеолит у сельскохозяйственных рабочих,
 экссудативную многоформную эритему, посткардиотомический синдром, синдром
 15 Кушинга, легочную аллергию птицеводов, аллергический гранулематозный ангиит,
 доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Алпорта, альвеолит, такой как
 аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное легочное
 заболевание, трансфузионную реакцию, проказу, малярию, лейшманиоз, кипаносомоз,
 20 шистосомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, синдром Каплана, денге,
 эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный интерстициальный легочный
 фиброз, интерстициальный легочный фиброз, легочный фиброз, идиопатический
 легочный фиброз, кистозный фиброз, эндофтальмит, возвышенную стойкую эритему,
 врожденную анемию новорожденных, эозинофильный фасциит, синдром Шутьмана,
 25 синдром Фелти, филяриоз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронный
 циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фуча, пурпuru Шенлейн-
 Геноха, инфекцию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), экзавирусную инфекцию,
 кардиомиопатию, болезнь Альцгеймера, парвовирусную инфекцию, инфекцию
 30 вирусом краснухи, синдромы поствакцинации, инфекцию краснушной эмбриопатии,
 инфекцию вирусом Эпштейн-Барра, эпидемический паротит, синдром Эвана,
 аутоиммунную гонадную недостаточность, хорею Сиденгама, постстрептококковый
 нефрит, облитерирующий тромбоангиит, тиреотоксикоз, прогрессирующую
 двигательную атаксию, хориоидит, гигантоклеточную полимиалгию, эндокринную
 35 офтальмопатию, хронический гиперчувствительный пневмонит, сухой
 кератоконъюнктивит, эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический
 нефритический синдром, нефропатия с минимальными изменениями, семейное
 доброкачественное и ишемическое-реперфузионное повреждение, аутоиммунное
 40 заболевание сетчатки, ревматоидный артрит, бронхит, хроническое обструктивное
 заболевание дыхательных путей, силикоз, афты, афтозный стоматит,
 артериосклеротические нарушения, нарушения спермиогенеза, аутоиммунный
 гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемию, контрактуру Дюпюитрена,
 факоанафилактический эндофтальмит, аллергический энтерит, нодозную эритему,
 45 идиопатический паралич лицевого нерва, синдром хронической усталости,
 ревматическую лихорадку, болезнь Хаммена-Рича, сенсоневральную потерю слуха,
 пароксизмальную гемоглобинурию, гипогонадизм, региональный илеит, лейкопению,
 инфекционный мононуклеоз, поперечный миелит, первичную идиопатическую
 50 микседему, нефроз, симпатическую офтальмию, гранулематозный орхит, панкреатит,
 острый полирадикулит, гангренозную пиодермию, тиреоидит Кервена,
 приобретенную атрофию селезенки, бесплодие вследствие антител против
 сперматозоидов, незлокачественную тимому, витилиго, SCID и связанные с вирусом

Эпштейна-Барра заболевания, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), заболевания, вызванные паразитами, такими как *Leishmania*, синдром токсического шока, пищевое отравление, состояния, в которые вовлечена инфильтрация Т-клеток, недостаточность адгезии лейкоцитов, иммунные ответы, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, в которые вовлечен диапедез лейкоцитов, синдром множественного органного повреждения, заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело, заболевание, вызванное антителами к клубочковой базальной мембране, аутоиммунные полиэндокринопатии, оофорит, первичную микседему, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическую офтальмию, ревматические заболевания, смешанное заболевание соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринную недостаточность, периферическую невропатию, аутоиммунный полигландулярный синдром типа I, идиопатический гипопаратиреоидизм взрослых (АОИ), генерализованную алопецию, дилатационную кардиомиопатию, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохроматоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит, этмоидальный, фронтальный, верхнечелюстной или сфеноидальный синусит, связанное с эозинофилами расстройство, такое как эозинофилия, эозинофильная инфильтрация легких, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера, хроническую эозинофильную пневмонию, тропическую легочную эозинофилию, бронхолегочный аспергиллез, аспергиллему или гранулемы, содержащие эозинофилы, анафилаксию, серонегативные спондилоартриты, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склеру, эписклеру, хронический слизисто-кожный кандидамикоз, синдром Брутона, транзиторную гипогаммаглобулинемию новорожденных, синдром Вискотта-Олдриджа, атаксию-телангиэктазию, аутоиммунные расстройства, связанные с коллагеновой болезнью, ревматизм, неврологическое заболевание, лимфаденит, ишемическое реперфузионное расстройство, снижение реакции кровяного давления, дисфункцию сосудов, ангиэктазию, повреждение тканей, сердечно-сосудистую ишемию, гипералгезию, ишемию головного мозга и заболевания, сопровождаемые васкуляризацией, аллергические гиперчувствительные расстройства, гломерулонефриты, реперфузионное повреждение, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, дерматозы с острыми воспалительными компонентами, острый гнойный менингит или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы, глазные и глазничные воспалительные расстройства, синдромы, связанные с трансфузией гранулоцитов, индуцированную цитокинами токсичность, нарколепсию, острое тяжелое воспаление, хроническое стойкое воспаление, пиелит, цирроз легкого, диабетическую ретинопатию, диабетическое поражение крупных артерий, внутриартериальную гиперплазию, пептическую язву, вальвулит и эндометриоз.

«Доброкачественное гиперпролиферативное расстройство» означает состояние у пациента, которое связано с пролиферацией клеток и которое оценивается членами медицинского сообщества как аномальное. Аномальное состояние характеризуется таким уровнем свойства, которое статистически отличается от уровня, наблюдаемого в организмах, не пораженных расстройством. Пролiferация клеток относится к росту или увеличению количества путем размножения клеток и включает в себя клеточное деление. Скорость пролиферации клеток можно измерить, подсчитывая количество клеток, образуемых за данную единицу времени. Примеры доброкачественных

гиперпролиферативных расстройств включают псориаз и полипы.

В «респираторное заболевание» вовлечена дыхательная система, и респираторные заболевания включают бронхит, астму, включая острую астму и аллергическую астму, кистозный фиброз, бронхоэктаз, аллергический или другой ринит или синусит, недостаточность α 1-антитрипсина, кашель, эмфизему легких, легочный фиброз или гиперреактивные дыхательные пути, хроническое обструктивное легочное заболевание и хроническое обструктивное заболевание легких.

«Псориаз» представляет собой состояние, которое характеризуется сыпью из очаговых, отдельных и слившихся красноватых, покрытых серебристыми чешуйками макулопапул. Псориазические поражения обычно имеют место преимущественно на локтях, коленях, коже головы и туловище и микроскопически проявляются характерным паракератозом и удлинением эпидермальных гребней. Термин включает различные формы псориаза, включая эритродермальную, пустулезную, средне-тяжелую и стойкую формы заболевания.

«Эндометриоз» относится к эктопическому явлению в эндометриальной ткани, часто образующей кисты, содержащие измененную кровь.

Термин «сосудистое заболевание или расстройство» в данном описании относится к различным заболеваниям или расстройствам, которые действуют на сосудистую систему, включая сердечно-сосудистую систему. Примеры таких заболеваний включают атеросклероз, повторную обструкцию сосудов, атеросклероз, постхирургический стеноз сосудов, рестеноз, окклюзию сосудов или обструктивное заболевание сонных артерий, заболевание коронарных артерий, стенокардию, болезнь малых сосудов, гиперхолестеринемию, гипертонию и состояния, в которые вовлечена аномальная пролиферация или функционирование эпителиальных клеток сосудов.

Термин «стеноз» относится к сужению или стриктуре полых проходов (например протока или канала) в организме.

Термин «стеноз сосудов» относится к окклюзии или сужению кровеносных сосудов. Стеноз сосудов часто возникает в результате отложения жиров (как в случае атеросклероза) или избыточной миграции и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов и эндотелиальных клеток. Артерии особенно подвержены стенозу. Термин «стеноз», как используется в данном описании, конкретно включает начальный стеноз и рестеноз.

Термин «рестеноз» относится к рецидиву стеноза после лечения начального стеноза с видимым успехом. Например, «рестеноз» в контексте стеноза сосудов относится к повторному появлению стеноза сосудов после его лечения с видимым успехом, например, удалением отложения жира ангиопластикой (например чрескожной транслуминальной ангиопластикой коронарных сосудов), прямой коронарной атерэктомией или с использованием стента и т.д. Одним из факторов, способствующих рестенозу, является интимальная гиперплазия. Термин «интимальная гиперплазия», используемый взаимозаменяемо с «неоинтимальной гиперплазией» и «образованием неоинтимы», относится к утолщению внутреннего слоя кровеносных сосудов, интимы, вследствие избыточной пролиферации и миграции гладкомышечных клеток сосудов и эндотелиальных клеток. Различные изменения, имеющие место во время рестеноза, часто вместе называют «ремоделированием стенок сосудов».

Термины «баллонная ангиопластика» и «чрескожная транслуминальная ангиопластика коронарных сосудов» (РТСА) часто используют взаимозаменяемо, и они относятся к нехирургическому, основанному на использовании катетера лечению для удаления бляшки из коронарной артерии. Стеноз или рестеноз часто приводит к

гипертонии в результате повышенной резистентности к кровотоку.

Термин «гипертония» относится к аномально высокому кровяному давлению, т.е. выше верхнего значения нормального диапазона.

Термин «полипы» относится к массе ткани, которая выступает или выдается в наружную или внутреннюю сторону от нормального уровня поверхности, при этом становясь видимой под микроскопом в виде полусферической, сферической структуры или структуры в виде неровного бугорка, растущей из относительно широкой основы или тонкой ножки. Примеры включают полипы ободочной кишки, прямой кишки и носа.

«Фиброаденома» относится к доброкачественной неоплазме, полученной из железистого эпителия, в которой имеется видимая строма из пролиферирующих фибробластов и элементы соединительной ткани. Фиброаденома обычно возникает в ткани молочной железы.

«Астма» является состоянием, которое приводит к затруднению дыхания. Бронхиальная астма относится к состоянию легких, при котором имеет место обширное сужение дыхательных путей, которое может быть следствием сокращения (спазма) гладкой мускулатуры, отека слизистой оболочки или слизи в просвете бронхов и бронхиол.

«Бронхит» относится к воспалению слизистой оболочки мелких бронхов.

В целях настоящего описания «флакон» относится к емкости, которая содержит терапевтическое средство. Флакон может быть герметично закрыт пробкой, прокалываемой шприцом. Обычно флакон сделан из стекла. Терапевтическое средство во флаконе может быть в различных состояниях, включая жидкое, лиофилизированное, замороженное и т.д.

«Вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, обычно вкладываемым в коммерческие упаковки терапевтических средств, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировании, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

II Получение антител

Следующее ниже описание приведено для иллюстрации способов получения HER-антител, используемых согласно настоящему изобретению. HER-антиген, используемый для получения антител, может представлять собой, например, растворимую форму внеклеточного домена HER или его части, содержащей требуемый эпитоп. Альтернативно, для создания антител можно использовать клетки, экспрессирующие HER на своей клеточной поверхности (например, клетки NIH-3T3, трансформированные для сверхэкспрессии HER2; или линию клеток карциномы, такую как клетки SK-BR-3, см. Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)). Другие формы рецептора HER, применимые для создания антитела, будут очевидны для специалистов в данной области.

(i) Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатывают у животных посредством нескольких подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование соответствующего антигена с белком, который является иммуногенным для иммунизируемого вида, например, с гемоцианином морского блюдечка «замочная скважина», сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои, с использованием бифункционального или дериватизирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимид (конъюгирование

через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 означают разные алкильные группы.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных, комбинируя, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъецируя раствор внутривенно в нескольких местах. Спустя месяц животных подвергают бустер-иммунизации, используя от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда, посредством подкожной инъекции в нескольких местах. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку в отношении титра антител. Животных подвергают бустер-иммунизации вплоть до выхода титра на плато. Предпочтительно животное подвергают бустер-иммунизации конъюгатом того же самого антигена, но конъюгированного с другим белком и/или с помощью другого поперечно сшивающего реагента. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слияний белков. Также соответствующим образом используют агрегирующие агенты, такие как квасцы, для усиления иммунного ответа.

(ii) Моноклональные антитела

В данной области имеются различные способы получения моноклональных антител. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием способа на основе гибридом, впервые описанного Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), или способами на основе рекомбинантной ДНК (патент США №4816567).

В способе на основе гибридом мышь или другого подходящего животного-хозяина, такого как хомячок, иммунизируют, как описано выше, чтобы вызвать появление лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфично связываться с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, такой как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или жизнеспособность неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то в культуральную среду для гибридом обычно включают гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), и такие вещества предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительные клетки миеломы представляют собой клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают на стабильно высоком уровне продукцию антител отобранными продуцирующими антитела клетками и чувствительны к такой среде, как среда HAT. Среди них предпочтительными линиями клеток миеломы являются линии клеток мышинной миеломы, такие как линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные из Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные из Американской коллекции типов культур, Rockville, Maryland, USA. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мышши-человека также были описаны для получения моноклональных

антител человека (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); и Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют в отношении продукции моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела, например, можно определить анализом по Скэтчарду, как описано в Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После того как установлено, что клетки гибридомы продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы способами лимитирующего разведения и выращены стандартными способами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие культуральные среды для указанной цели включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки обычными способами очистки антител, такими как, например, хроматография с использованием белок А-сефарозы, гидроксилапатита, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют, используя обычные способы (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок антитела, чтобы получить синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи о рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993), и Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

В другом варианте моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных с использованием способа, описанного в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), описывают выделение мышинных и человеческих антител, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В последующих публикациях описано получение высокоаффинных (нМ-диапазон) антител человека с помощью перетасовки цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и рекомбинации *in vivo* в качестве методики конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, указанные способы являются приемлемой альтернативой традиционным способам на основе продуцирующих моноклональные антитела гибридом для выделения моноклональных антител.

ДНК также может быть модифицирована, например, подстановкой кодирующей

последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных мышинных последовательностей (патент США №4816567 и Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)) или ковалентным связыванием с кодирующей иммуноглобулин последовательностью всей или части

последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид. Обычно такими неиммуноглобулиновыми полипептидами заменяют константные домены антитела или ими заменяют переменные домены одного антигенсвязывающего участка антитела, чтобы создать химерное бивалентное антитело, содержащее один антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность по отношению к антигену, и другой антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность по отношению к другому антигену.

(iii) Гуманизированные антитела

Способы гуманизации антител животных, отличных от человека, описаны в данной области. Предпочтительно гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который отличен от человека. Указанные аминокислотные остатки животного, отличного от человека, часто называют «импортируемыми» остатками, которые обычно берут из «импортируемого» переменного домена. Гуманизацию можно по существу выполнить, следуя способу Винтера и соавторов (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), заменой последовательностями гиперпеременных областей соответствующих последовательностей антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США №4816567), в которых значительно меньшая часть, чем интактный переменный домен человека, была заменена соответствующей последовательностью вида, отличного от человека. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гиперпеременной области и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор переменных доменов человека, как легкой, так и тяжелой цепи, используемых для получения гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. Согласно так называемому способу «оптимальной подгонки» последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу по сравнению с полной библиотекой известных последовательностей переменных доменов человека. Последовательность человека, которая наиболее близка последовательности грызуна, затем берут в качестве каркасной области (FR) человека для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких разных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности по отношению к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения указанной цели, согласно предпочтительному способу, гуманизированные антитела получают, проводя анализ исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных

последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и показывают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных для исследования последовательностей иммуноглобулина.

Исследование таких изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании выбранной для исследования последовательности иммуноглобулина, т.е. анализировать остатки, которые влияют на способность выбранного для исследования иммуноглобулина связывать соответствующий ему антиген. Таким образом, могут быть выбраны и объединены остатки FR из реципиентных и импортируемых последовательностей так, чтобы достичь требуемых характеристик антитела, таких как повышенная аффинность по отношению к антигену(нам)-мишени. В общем, остатки гипервариабельной области непосредственно и в наибольшей степени влияют на связывание антигена.

В WO 01/00245 описано получение типичных гуманизированных HER2-антител, которые связывают HER2 и блокируют активацию рецептора HER лигандом. Гуманизированное антитело, представляющее особый интерес согласно изобретению, блокирует опосредованную EGF, TGF- α и/или HRG активацию MAPK по существу так же эффективно, как и мышинное моноклональное антитело 2C4 (или его Fab-фрагмент), и/или связывает HER2 по существу так же эффективно, как и мышинное моноклональное антитело 2C4 (или его Fab-фрагмент). Гуманизированное антитело согласно изобретению может, например, содержать остатки гипервариабельной области животного, отличного от человека, включенные в вариабельный домен тяжелой цепи человека, и может дополнительно содержать замену в каркасной области (FR) в положении, выбранном из группы, состоящей из 69H, 71H и 73H, используя систему нумерации вариабельного домена, приведенную в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). В одном варианте гуманизированное антитело содержит замены в FR в двух или во всех положениях 69H, 71H и 73H.

Типичное гуманизированное антитело, представляющее интерес согласно изобретению, содержит определяющие комплементарность остатки вариабельного домена тяжелой цепи GFTFTDYTMX, где X предпочтительно означает D или S (SEQ ID NO:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:8) и/или NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), необязательно содержащие аминокислотные модификации таких остатков CDR, например модификации, по существу сохраняющие или повышающие аффинность антитела. Например, представляющий интерес вариант антитела может иметь примерно от одной до семи или примерно пять аминокислотных замен в указанной выше последовательности CDR вариабельного домена тяжелой цепи. Такие варианты антител могут быть получены созревaniem аффинности, например, как описано ниже. Наиболее предпочтительное гуманизированное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:4.

Гуманизированное антитело может содержать остатки определяющей комплементарности области вариабельного домена легкой цепи KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, где X¹ предпочтительно означает R или L, X² предпочтительно означает Y или E, и X³ предпочтительно означает T или S (SEQ ID NO:11); и/или QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), например, дополнительно к остаткам CDR вариабельного домена тяжелой цепи, указанным в предыдущем абзаце. Такие гуманизированные антитела необязательно содержат аминокислотные модификации указанных выше остатков CDR, например модификации, по существу сохраняющие

или повышающие аффинность антитела. Например, представляющий интерес вариант антитела может иметь примерно от одной до семи или примерно пять аминокислотных замен в указанной выше последовательности CDR варибельного домена легкой цепи. Такие варианты антител могут быть получены созревaniem аффинности, например, как описано ниже. Наиболее предпочтительное гуманизированное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO:3.

Настоящая заявка также относится к антителам с созревшей аффинностью, которые связывают HER2 и блокируют активацию рецептора HER лигандом. Исходным антителом может быть антитело человека или гуманизированное антитело, например антитело, содержащее последовательности варибельного домена легкой и/или тяжелой цепи SEQ ID No. 3 и 4, соответственно (т.е. варианта 574). Аффинно созревшее антитело предпочтительно связывается с рецептором HER2 с аффинностью, превосходящей аффинность мышиного 2C4 или варианта 574 (например, примерно в два или примерно в четыре раза повышенная аффинность и примерно в 100 раз или примерно в 1000 раз повышенная аффинность, например, оцениваемая с использованием ELISA HER2-внеклеточного домена (ECD)). Типичные остатки CDR варибельного домена тяжелой цепи для замены включают H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 или комбинации двух или более (например двух, трех, четырех, пяти, шести или семи указанных остатков). Примеры остатков CDR варибельного домена легкой цепи для изменения включают L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 или комбинации двух или более (например от двух до трех, четырех, пяти или до десяти указанных остатков).

Рассматриваются различные формы гуманизированного антитела или аффинно созревшего антитела. Например, гуманизированное антитело или аффинно созревшее антитело может представлять собой фрагмент антитела, такой как Fab, который необязательно конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими средствами с образованием иммуноконъюгата. Альтернативно, гуманизированное антитело или аффинно созревшее антитело может представлять собой интактное антитело, такое как интактное IgG1-антитело. Предпочтительное интактное IgG1-антитело содержит последовательность легкой цепи SEQ ID NO:13 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14.

(iv) Человеческие антитела

В качестве альтернативы гуманизации могут быть созданы человеческие антитела. Например, в настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединяющей области тяжелой цепи (J_H) антитела у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос ряда генов иммуноглобулина зародышевой линии человека в таких мутантных по зародышевой линии мышей будет приводить к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); и патенты США №№5591669, 5589369 и 5545807.

Альтернативно можно использовать методику фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов варибельных (V) доменов иммуноглобулина от

неиммунизированных доноров. Согласно указанному способу гены V-доменов антител клонируют в рамке с геном либо основного, либо минорного белка оболочки нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и выводят в виде функциональных фрагментов антител на поверхность фаговой частицы. Поскольку нитчатая частица содержит одноклеточную копию ДНК фагового генома, то селекция на основе функциональных свойств антитела также приводит к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клетки. Фаговый дисплей может быть выполнен в разных формах, обзор которых приведен, например, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников участков V-генов. Например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) выделили ряд разнообразных антител против оксазолон из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенок иммунизированных мышей. Можно сконструировать репертуар V-генов неиммунизированных людей-доноров, и можно выделить антитела к ряду разнообразных антигенов (включая аутоантигены), по существу следуя, например, способу, описанному Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См. также патенты США №№5565332 и 5573905.

Как обсуждалось выше, антитела человека также могут быть образованы активированными *in vitro* В-клетками (см. патенты США 5567610 и 5229275).

HER2-антитела человека описаны в патенте США №5772997, опубликованном 30 июня 1998, и в WO 97/00271, опубликованной 3 января 1997.

(v) Фрагменты антител

Разработаны различные способы получения фрагментов антител, содержащих одну или несколько антигенсвязывающих областей. Традиционно такие фрагменты получали в результате протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992), и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время такие фрагменты могут непосредственно продуцироваться рекомбинантными клетками-хозяевами. Например, фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно извлечены из клеток *E.coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Согласно другому способу F(ab')₂-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут известны специалистам в данной области. В других вариантах предпочтительное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, патент США №5571894 и патент США №5587458. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

(vi) Биспецифичные антитела

Биспецифичные антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичности связывания по меньшей мере к двум разным эпитопам. Типичные биспецифичные антитела могут связываться с двумя разными эпитопами белка HER. В других таких антителах сайт связывания HER2 может быть объединен с сайтом (сайтами) связывания EGFR, HER3 и/или HER4. Альтернативно, плечо к HER2 можно объединить с плечом, которое связывается с запускающей молекулой на лейкоците,

такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3), или Fc-рецепторами для IgG (FcγR), такими как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), для того чтобы сфокусировать механизмы клеточной защиты на HER2-экспрессирующей клетке. Биспецифичные антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств у клеток, которые экспрессируют HER2. Указанные антитела имеют HER2-связывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксическое средство (например сапорин, антиинтерферон-α, алкалоид барвинка, цепь А рицина, метотрексат или гаптен радиоактивного изотопа). Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичные F(ab')₂-антитела).

В WO 96/16673 описано биспецифичное HER2/FcγRIII-антитело, и в патенте США №5837234 описано биспецифичное HER2/FcγRI-антитело IDM1 (Osidem).

Биспецифичное HER2/Fcα-антитело показано в WO 98/02463. В патенте США №5821337 описано биспецифичное HER2/CD3-антитело. MDX-210 является биспецифичным HER2-FcγRIII-Ab.

Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, при этом две цепи имеют разные специфичности (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного выбора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина такие гибридомы (квадромы) продуцируют возможную смесь 10 разных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно осуществляют, используя стадии аффинной хроматографии, является довольно громоздкой, а выходы продукта - низкими. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829 и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Согласно другому способу переменные домены антител с требуемыми специфичностями связывания (участки связывания антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, областей CH2 и CH3. Предпочтительно иметь первую константную область тяжелой цепи (CH1), содержащую сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, в случае необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и котрансфицируют в подходящий организм хозяина. Это дает большую гибкость при корректировке взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в таких вариантах, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, дают оптимальные выходы. Однако можно встраивать кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор в том случае, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях дает высокие выходы или когда соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте указанного способа биспецифичные антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридной пары тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом

плече. Обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает отделение требуемого биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифичной молекулы обеспечивает простой способ разделения. Такой способ описан в WO 94/04690. Более подробное описание создания биспецифичных антител см., например, в Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Согласно другому способу, описанному в патенте США №5731168, область контакта между парой молекул антител может быть сконструирована так, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, которые извлекают из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная область контакта содержит по меньшей мере часть домена C_H3 константного домена антитела. В указанном способе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). Создают компенсирующие «впадины», имеющие размер, идентичный или сходный с размером большой боковой цепи (цепей), на области контакта второй молекулы антитела, заменяя большие боковые цепи аминокислот меньшими боковыми цепями (например, аланина или треонина). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифичные антитела включают поперечно сшитые антитела или «гетероконъюгаты» антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое - с биотином. Такие антитела, например, были предложены для направления клеток иммунной системы к нежелательным клеткам (патент США №4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгаты антител могут быть получены с использованием любого удобного способа образования поперечных сшивок. Подходящие поперечно сшивающие агенты хорошо известны в данной области и описаны в патенте США №4676980 наряду с описанием ряда способов образования поперечных сшивок.

Способы создания биспецифичных антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифичные антитела могут быть получены с использованием химического связывания. Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985), описывают способ, при котором интактные антитела протеолитически расщепляют, чтобы создать F(ab')₂-фрагменты. Полученные фрагменты восстанавливают в присутствии агента, образующего комплексы дитиола, арсенита натрия, чтобы стабилизировать соседние дитиолы и предотвратить образование межмолекулярного дисульфида. Затем созданные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Один из Fab'-TNB-производных затем снова превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламинамином и смешивают с эквимольным количеством другого Fab'-TNB-производного с образованием биспецифичного антитела. Полученные биспецифичные антитела можно использовать в качестве агентов для избирательной иммобилизации ферментов.

Недавние достижения облегчили прямое извлечение Fab'-SH-фрагментов из *E.coli*, которые могут быть химически связаны с образованием биспецифичных антител. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992), описывают получение полностью гуманизированной молекулы биспецифичного антитела на основе F(ab')₂. Каждый Fab'-фрагмент отдельно секретировался из клеток *E.coli*, и его подвергали химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифичного антитела. Образованное таким образом биспецифичное антитело способно связываться с клетками,

сверхэкспрессирующими рецептор HER2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против опухолей-мишеней молочной железы человека.

Также описаны различные способы получения и выделения биспецифичных фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, были получены биспецифичные антитела с использованием лейциновых молний. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun связывали с Fab'-частями двух разных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области, чтобы образовать мономер, и затем снова окисляли с образованием гетеродимеров антител. Такой способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Способ «димерных антител», описанный Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), обеспечил альтернативный механизм получения биспецифичных фрагментов антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), связанный с переменным доменом легкой цепи (V_L) линкером, который является слишком коротким, чтобы обеспечить возможность спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, образуя при этом два антигенсвязывающих участка. Также сообщалось о другой методике получения биспецифичных фрагментов антител с использованием димеров одноцепочечного Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Предполагаются антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифичные антитела. Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

(vii) Другие модификации аминокислотных последовательностей

Предлагается модификация(ии) аминокислотных последовательностей антител, описанных в данном описании. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотной последовательности антитела. Осуществляют любую комбинацию делеции, инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционные процессы в антителах, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Применимый способ идентификации некоторых остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными участками для мутагенеза, называют «мутагенезом с использованием аланинового сканирования», как описано Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989). В данном случае идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те участки аминокислот, которые проявляют функциональную чувствительность к заменам, затем улучшают введением дополнительных или других вариантов в участки или вместо участков замены. Таким образом, хотя участок введения варианта аминокислотной последовательности предварительно определяют, нет необходимости в предварительном определении

природы мутации как таковой. Например, чтобы проанализировать эффективность мутации в данном участке, проводят ala-сканирование или случайный мутагенез в кодоне-мишени или области-мишени и экспрессированные варианты антител подвергают скринингу в отношении требуемой активности.

Инсерции в аминокислотных последовательностях включают слияния с аминокислотным концом длиной в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым остатком метионина или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, в случае ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

Вариантом другого типа является вариант с аминокислотными заменами. Такие варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Места, представляющие наибольший интерес для мутагенеза путем замены, включают гипервариабельные области, но также предполагаются изменения и в FR. Консервативные замены показаны в таблице 1 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены дополнительные существенные изменения, названные «примерными заменами» в таблице 1, или изменения, дополнительно описанные ниже при описании классов аминокислот, и может быть проведен скрининг продуктов.

Таблица 1		
Исходный остаток	Примерные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют отбором замен, которые существенно отличаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде слоистой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (с) величины боковой цепи. Аминокислоты могут быть

сгруппированы в соответствии со сходствами в свойствах их боковых цепей (в A.L. Lehninger, Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M);
- (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q);
- (3) кислые: Asp (D), Glu (E);
- (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H).

Альтернативно, встречающиеся в природе остатки могут быть разделены на группы на основе общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены влекут за собой замену представителя одного из указанных классов представителем другого класса.

Любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержание правильной конформации антитела, также может быть заменен, обычно серином, чтобы повысить стабильность молекулы к окислению и предотвратить аномальное поперечное сшивание. Наоборот, может быть добавлена цистеиновая связь (связи) к антителу, чтобы повысить его стабильность (особенно когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Особенно предпочтительный тип варианта с заменами содержит замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный в результате вариант(ы), отобранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого он создан. Подходящий способ создания таких вариантов с заменами заключается в созревании аффинности с использованием фагового дисплея. Коротко, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутировали, чтобы создать все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антитела представляют в виде дисплея в моновалентной форме на частицах нитчатого фага в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованного в каждой частице. Представленные в фаговом дисплее варианты затем подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как описано в данной публикации. Чтобы идентифицировать подходящие для модификации сайты гипервариабельной области, можно осуществить мутагенез путем аланинового сканирования, идентифицируя остатки гипервариабельной области, вносящие существенный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезным анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и HER2 человека. Такие остатки в области контакта и соседние остатки являются кандидатами на замену согласно способам, разработанным согласно изобретению. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данной публикации, и антитела с превосходящими свойствами в одном или нескольких подходящих анализах можно отобрать для дальнейшей разработки.

В другом типе аминокислотного варианта антитела изменена исходная картина

гликозилирования антитела. Под изменением подразумевают делецию одного или нескольких углеводных остатков, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в антителе.

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным.
 5 N-связанный относится к связыванию углеводного остатка с боковой цепью остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X означает любую аминокислоту, за исключением пролина, являются известными последовательностями для ферментативного связывания углеводного
 10 остатка с боковой цепью аспарагина. Таким образом, присутствие любой из указанных трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к связыванию одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы с
 15 гидроксикаминокислотой, чаще всего серином или треонином, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу обычно осуществляют посредством изменения аминокислотной последовательности, так чтобы она содержала одну или несколько из описанных выше трипептидных
 20 последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществить добавлением (или заменой) одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

В том случае, когда антитело содержит Fc-область, может быть изменен связанный
 25 с ним углевод. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой утрачена фукоза, связанная с Fc-областью антитела, описаны в заявке на выдачу патента США № US 2003/0157108 A1, Presta, L., см. также US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с разветвляющимся N-ацетилглюкозамином (GlcNAc)
 30 в углеводе, связанном с Fc-областью антитела, описаны в WO 03/011878, Jean-Mairet et al., и в патенте США №6602684, Umana et al. Антитела по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахаридах, связанном с Fc-областью антитела, описаны в WO 97/30087, Patel et al. См. также заявки на выдачу патента WO 98/58964 (Raju, S.) и WO 99/22764 (Raju, S.), касающиеся антител с измененным углеводом, связанным с
 35 их Fc-областью.

Может быть желательной модификация антитела согласно изобретению в отношении эффекторной функции так, чтобы, например, повысить антигензависимую опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC) и/или зависимость от комплемента
 40 цитотоксичность (CDC) антитела. Этого можно достичь введением одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. Альтернативно или дополнительно, остаток(ки) цистеина могут быть введены в Fc-область, таким образом, обеспечивая возможность образования межцепочечного дисульфида в данной области. Созданное таким образом гомодимерное антитело может обладать
 45 улучшенной способностью к интернализации и/или повышенному опосредованному комплементом цитолизу клеток и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). См. Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992), и Shopes, B.J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной
 50 противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных поперечно сшивающих агентов, которые описаны в Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Альтернативно, может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-области и в связи с этим обладает повышенной

способностью к зависимому от комплемента лизису и ADCC. См. Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

В WO 00/42072 (Presta, L.) описаны антитела с улучшенной ADCC-функцией в присутствии эффекторных клеток человека, при этом антитела содержат аминокислотные замены в своей Fc-области. Предпочтительно антитело с улучшенной ADCC содержит замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области. Предпочтительно измененная Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека, содержащую или состоящую из замен в одном, двух или трех из указанных положений.

Антитела с измененным связыванием C1q и/или зависимой от комплемента цитотоксичностью (CDC) описаны в WO 99/51642, патенте США №6194551 B1, патенте США №6242195 B1, патенте США №6528624 B1 и патенте США №6538124 (Idusogie et al.). Антитела содержат аминокислотную замену в одном или нескольких положениях аминокислот 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 и/или 334 Fc-области.

Чтобы увеличить время полужизни антитела в сыворотке, можно включить в антитело (в частности, во фрагмент антитела) эпитоп связывания рецептора спасения, как описано, например, в патенте США 5739277. Как используется в данном описании, термин «эпитоп связывания рецептора спасения» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), который ответственен за увеличение времени полужизни молекулы IgG в сыворотке *in vivo*.

Антитела с улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и повышенным временем полужизни описаны в WO 00/42072 (Presta, L.). Такие антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Например, Fc-область может иметь замены в одном или нескольких положениях 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434. Предпочтительный вариант антитела, содержащий Fc-область с улучшенным связыванием FcRn, содержит аминокислотные замены в одном, двух или трех положениях 307, 380 и 434 Fc-области.

Также предусмотрены сконструированные антитела с тремя или более (предпочтительно четырьмя) функциональными антигенсвязывающими сайтами (заявка на выдачу патента США № US 2002/0004587 A1, Miller et al.).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными в данной области. Такие способы включают, без ограничения, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с использованием опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-специфичного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или версии антитела, не являющейся вариантом.

(viii) Скрининг антител с требуемыми свойствами

Способы создания антител описаны выше. Кроме того, можно отобрать антитела с определенными биологическими свойствами, которые требуются.

Чтобы идентифицировать антитело, которое блокирует активацию лигандом рецептора HER, можно определить способность антитела блокировать связывание лиганда HER с клетками, экспрессирующими рецептор HER (например, конъюгированный с другим рецептором HER, с которым представляющий интерес рецептор HER образует HER-гетероолигомер). Например, клетки, экспрессирующие в природе или трансфицированные для экспрессии рецепторов HER HER-

гетероолигомера, можно инкубировать с антителом и затем подвергнуть воздействию меченого лиганда HER. Затем можно оценить способность антитела блокировать связывание лиганда с рецептором HER в HER-гетероолигомере.

Например, ингибирование связывания HRG с линиями опухолевых клеток молочной железы MCF7 HER2-антителами можно осуществить с использованием монослойных культур MCF7 на льду в 24-луночной планшете, по существу, как описано в WO 01/00245. В каждую лунку можно добавить моноклональные HER2-антитела и инкубировать в течение 30 минут. Затем можно добавить ^{125}I -меченый gHRG $\beta 1_{177-224}$ (25 пМ) и инкубацию можно продолжить в течение 4-16 часов. Можно получить кривые зависимость от дозы ответа и рассчитать значение IC_{50} для представляющего интерес антитела. В одном варианте антитело, которое блокирует активацию лигандом рецептора HER, будет иметь IC_{50} по отношению к ингибированию связывания HRG с клетками MCF7, составляющую в данном анализе примерно 50 нМ или меньше, более предпочтительно 10 нМ или меньше. В том случае, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab-фрагмент, IC_{50} по отношению к ингибированию связывания HRG с клетками MCF7 в данном анализе может например составлять примерно 100 нМ или меньше, более предпочтительно 50 нМ или меньше.

Альтернативно или дополнительно, можно проанализировать способность антитела блокировать стимулируемое лигандом HER фосфорилирование тирозина рецептора HER, присутствующего в HER-гетероолигомере. Например, клетки, эндогенно экспрессирующие рецепторы HER или трансфицированные для экспрессии рецепторов HER, можно инкубировать с антителом и затем оценить активность зависимость от лиганда HER фосфорилирования тирозина с использованием моноклонального антитела против фосфотирозина (которое необязательно конъюгировано с регистрируемой меткой). Анализ активации киназного рецептора, описанный в патенте США №5766863, также пригоден для определения активации рецептора HER и блокирования такой активности антителом.

В одном варианте можно провести скрининг в отношении антитела, которое ингибирует HER-стимуляцию фосфорилирования тирозина p180 в клетках MCF7, по существу, как описано в WO 01/00245. Например, клетки MCF7 можно посеять в 24-луночные планшеты и в каждую лунку добавить моноклональные антитела к HER2 и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре; затем в каждую лунку можно добавить gHRG $\beta 1_{177-244}$ до конечной концентрации 0,2 нМ и инкубацию можно продолжить в течение 8 минут. Среду можно аспирировать из каждой лунки и реакции можно остановить добавлением 100 мкл буфера для образцов с SDS (5% SDS, 25 мМ DTT и 25 мМ трис-HCl, pH 6,8). Каждый образец (25 мкл) может быть подвергнут электрофорезу в 4-12%-градиентном геле (Novex) и затем электрофоретически перенесен на мембрану из поливинилидендифторида. Можно проявить иммуноблоты антифосфотирозина (при 1 мкг/мл) и можно количественно оценить интенсивность преимущественной реактивной полосы с M_r - 180000 отражательной денситометрией. Отобранное антитело предпочтительно будет в значительной степени ингибировать HRG-стимуляцию фосфорилирования тирозина p180 примерно до 0-35% от контроля в данном анализе. Можно получить кривые зависимость от дозы ответа в отношении ингибирования HRG-стимуляции фосфорилирования тирозина p180, которые определяют отражательной денситометрией, и можно рассчитать IC_{50} для представляющего интерес антитела. В одном варианте антитело, которое блокирует активацию лигандом рецептора HER,

будет иметь IC₅₀ в отношении ингибирования HRG-стимуляции фосфорилирования тирозина p180 в данном анализе примерно 50 нМ или меньше, более предпочтительно 10 нМ или меньше. В том случае, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab-фрагмент, IC₅₀ в отношении ингибирования HRG-стимуляции фосфорилирования тирозина p180 в данном анализе может, например, составлять примерно 100 нМ или меньше, более предпочтительно 50 нМ или меньше.

Также можно оценить ингибирующее рост влияние антитела на клетки MDA-MB-175, например, по существу, как описано в Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Согласно данному анализу клетки MDA-MB-175 можно обработать моноклональным HER2-антителом (10 мкг/мл) в течение 4 суток и окрасить кристаллическим фиолетовым. Инкубация с HER2-антителом может показать ингибирующее рост влияние на указанную линию клеток, подобное влиянию, оказываемому моноклональным антителом 2C4. В следующем варианте экзогенный HRG по существу не будет отменять такое ингибирование. Предпочтительно антитело будет способно ингибировать пролиферацию клеток MDA-MB-175 в большей степени, чем моноклональное антитело 4D5 (и необязательно в большей степени, чем моноклональное антитело 7F3), как в присутствии, так и в отсутствие экзогенного HRG.

В одном варианте представляющее интерес HER2-антитело может блокировать зависимое от херегулина связывание HER2 с HER3 как в клетках MCF7, так и в клетках SK-BR-3, которое определяют в эксперименте по коиммунопреципитации, таком как описано в WO 01/00245, в значительной степени более эффективно, чем моноклональное антитело 4D5, и предпочтительно в значительной степени более эффективно, чем моноклональное антитело 7F3.

Чтобы идентифицировать ингибирующие рост HER2-антитела, можно провести скрининг в отношении антител, которые ингибируют рост злокачественных клеток, которые сверхэкспрессируют HER2. В одном варианте представляющее интерес ингибирующее рост антитело способно ингибировать рост клеток SK-BR-3 в культуре клеток примерно на 20-100% и предпочтительно примерно на 50-100% при концентрации антитела примерно от 0,5 до 30 мкг/мл. Чтобы идентифицировать такие антитела, можно провести анализ SK-BR-3, описанный в патенте США №5677171. Согласно указанному анализу клетки SK-BR-3 выращивают в смеси 1:1 среды F12 и DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамина и пенициллина и стрептомицина. Клетки SK-BR-3 высевает по 20000 клеток на чашку для культуры клеток диаметром 35 мм (2 мл/чашку диаметром 35 мм). В чашку добавляют от 0,5 до 30 мкг/мл HER2-антитела. Через шесть дней подсчитывают количество клеток по сравнению с необработанными клетками, используя электронный счетчик клеток COULTER™. Такие антитела, которые ингибируют рост клеток SK-BR-3 примерно на 20-100% или примерно на 50-100%, могут быть отобраны в качестве ингибирующих рост антител. См. патент США №5677171 в отношении анализа для скрининга ингибирующих рост антител, таких как 4D5 и 3E8.

Для отбора антител, которые индуцируют апоптоз, пригоден анализ связывания аннексина с использованием клеток BT474. Клетки BT474 культивируют и высевают на чашки, как обсуждалось в предыдущем абзаце. Затем среду удаляют и заменяют только свежей средой или средой, содержащей 10 мкг/мл моноклонального антитела. После трехдневного периода инкубации монослой промывают PBS и отделяют трипсинизацией. Затем клетки центрифугируют, ресуспендируют в связывающем Ca²⁺ буфере и делят на аликвоты в пробирки, как обсуждалось выше для анализа гибели

клеток. Затем в пробирки вносят меченый аннексин (например, аннексин V-FTIC) (1 мкг/мл). Образцы можно проанализировать с использованием проточного цитометра FACSCAN™ и компьютерной программы FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Антитела, которые индуцируют статистически значимые уровни связывания аннексина по сравнению с контролем, отбирают в качестве индуцирующих апоптоз антител. Кроме анализа связывания аннексина, существует анализ окрашивания ДНК с использованием клеток BT474. Чтобы осуществить такой анализ, клетки BT474, которые были обработаны представляющим интерес антителом, как описано в двух предыдущих абзацах, инкубируют с 9 мкг/мл НОЕCHST 33342™ в течение 2 ч при 37°C, затем анализируют на проточном цитометре EPICS ELITE™ (Coulter Corporation), используя компьютерную программу MODFIT LT™ (Verity Software House). Антитела, которые индуцируют изменение процентного содержания апоптозных клеток, которое в 2 раза или более (и предпочтительно в 3 раза или более), чем содержание в необработанных клетках (вплоть до 100% апоптозных клеток), могут быть отобраны в качестве проапоптозных антител с использованием данного анализа. См. WO 98/17797 в отношении анализа скрининга антител, которые индуцируют апоптоз, таких как 7C2 и 7F3.

Чтобы провести скрининг антител, которые связываются с эпитопом на HER2, связываемым представляющим интерес антителом, можно осуществить обычный анализ перекрестного блокирования, такой как анализ, описанный в Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), чтобы оценить, имеет ли место перекрестное блокирование антителом связывания такого антитела, как 2C4 или пертузумаб, с HER2. Альтернативно или дополнительно, можно осуществить картирование эпитопов способами, известными в данной области, и/или можно исследовать структуру комплекса антитело-HER2 (Franklin et al. Cancer Cell 5: 317-328 (2004)), чтобы выявить, какой домен(ы) HER2 связывается антителом.

(ix) Композиции пертузумаба

В одном из вариантов композиция HER2-антитела содержит смесь антитела пертузумаба основного вида и один или несколько его вариантов. Предпочтительный вариант согласно изобретению антитела пертузумаба основного вида представляет собой антитело, содержащее аминокислотные последовательности вариabельного домена легкой цепи и вариabельного домена тяжелой цепи SEQ ID No. 3 и 4 и наиболее предпочтительно содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID No. 13 и 17, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID No. 14 и 18 (включая дезаминированные и/или окисленные варианты указанных последовательностей). В одном варианте композиция содержит смесь антитела пертузумаба основного вида и вариант его аминокислотной последовательности, содержащий удлинение в виде аминоконцевого лидера.

Предпочтительно удлинение в виде аминоконцевого лидера находится на легкой цепи варианта антитела (например, на одной или двух легких цепях варианта антитела).

Антитело HER2 основного вида или вариант антитела может представлять собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела (например, Fab F(ab')₂-фрагментов), но предпочтительно они являются полноразмерными антителами. Вариант антитела согласно изобретению может содержать удлинение в виде аминоконцевого лидера на любой одной или нескольких тяжелых или легких цепях. Предпочтительно удлинение в виде аминоконцевого лидера находится на одной или двух легких цепях антитела. Удлинение в виде аминоконцевого лидера предпочтительно содержит или состоит из VHS-. Наличие удлинения в виде аминоконцевого лидера в композиции можно

определить различными аналитическими способами, включая, без ограничения, анализ N-концевой последовательности, анализ гетерогенности заряда (например, катионообменная хроматография или капиллярный зональный электрофорез), масс-спектрометрию и т.д. Количество варианта антитела в композиции обычно находится в диапазоне от количества, которое составляет предел определения в каком-либо анализе (предпочтительно в анализе N-концевой последовательности), используемом для определения варианта, до количества, меньшего, чем количество антитела основного вида. Как правило, примерно 20% или меньше (например, примерно от 1% до примерно 15%, например от 5% до примерно 15%) молекул антител в композиции содержат удлинение в виде аминоконцевого лидера. Такое количество в процентах предпочтительно определяют с использованием количественного анализа N-концевой последовательности или катионообменного анализа (предпочтительно с использованием слабой катионообменной колонки с высоким разрешением, такой как катионообменная колонка PROPAC WCX-10™). Помимо варианта с удлинением в виде аминоконцевого лидера, предполагаются дополнительные изменения аминокислотной последовательности антитела основного вида и/или варианта, включая, без ограничения, антитело, содержащее C-концевой остаток лизина в одной или обеих тяжелых цепях, дезаминированный вариант антитела и т.д.

Кроме того, антитело основного вида или вариант могут дополнительно содержать варианты гликозилирования, неограничивающие примеры которых включают антитело, содержащее олигосахаридную структуру G1 или G2, связанную с его Fc-областью, антитело, содержащее углеводный остаток, связанный с его легкой цепью (например, один или два углеводных остатка, таких как глюкоза или галактоза, связанных с одной или двумя легкими цепями антитела, например, связанных с одним или несколькими остатками лизина), антитело, содержащее одну или две негликозилированные тяжелые цепи, или антитело, содержащее сialiрированный олигосахарид, связанный с одной или двумя тяжелыми цепями, и т.д.

Композиция может быть получена из генетически сконструированной линии клеток, например линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующей HER2-антитело, или может быть получена пептидным синтезом.

(х) Иммуноконъюгаты

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин (например, низкомолекулярный токсин или ферментативно активный токсин, происходящий из клеток бактерий, грибов, растений или животных, включая его фрагменты и/или варианты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Химиотерапевтические средства, применимые для создания таких иммуноконъюгатов, были описаны выше. Также предполагаются конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, мейтанзин (патент США №5208020), трихотен и CC1065.

В одном предпочтительном варианте изобретения антитело конъюгируют с одной или несколькими молекулами мейтанзина (например, примерно от 1 до 10 молекул мейтанзина на молекулу антитела). Мейтанзин может быть, например, превращен в May-SS-Me, который может быть восстановлен до May-SH3 и подвергнут взаимодействию с модифицированным антителом (Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)), чтобы создать иммуноконъюгат мейтанзиноид-антитело.

Другой представляющий интерес иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина.

Калихеамициновое семейство антибиотиков способно вызывать двунитевые разрывы ДНК в субпикомолярных концентрациях. Можно использовать структурные аналоги калихеамицина, включая, без ограничения, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), и Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). См. также патенты США №№5714586, 5712374, 5264586 и 5773001, специально включенные в данное описание в виде ссылки.

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают цепь А дифтерийного токсина, не связывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор Saponaria officinalis, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, неомицин и трикотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993.

Настоящее изобретение дополнительно относится к иммуноконъюгату, образованному между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Имеется множество радиоактивных изотопов для получения радиоконъюгированных HER2-антител. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P и радиоактивные изотопы Lu.

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства могут быть получены с использованием множества бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис(пара-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al. Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгирования радионуклида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотолabile линкер, чувствительный к пептидазе линкер, линкер, содержащий диметил, или линкер, содержащий дисульфид (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)).

Альтернативно можно получить слитый белок, содержащий антитело и цитотоксическое средство, например, рекомбинантными способами или пептидным синтезом.

В данном изобретении предусмотрены другие иммуноконъюгаты. Например, антитело может быть связано с одним из множества небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем, полиоксиалкиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антитело также может быть заключено в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или межфазной полимеризацией (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или

желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Антитела, раскрытые в данном изобретении, также могут быть приготовлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как способы, описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); патентах США №№4485045 и 4544545 и WO 97/38731, опубликованной 23 октября 1997. Липосомы с повышенным периодом циркуляции описаны в патенте США №5013556.

Особенно применимые липосомы могут быть получены способом обращенно-фазового выпаривания с использованием композиции липидов, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизованный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы требуемого диаметра. Fab'-фрагменты антитела согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство. См. Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

III Отбор пациентов для терапии

В данном случае пациента необязательно подвергают диагностическому тестированию перед проведением терапии. Например, при диагностическом тестировании можно оценивать экспрессию HER (например, HER2 или EGFR) (включая сверхэкспрессию), амплификацию и/или активацию (включая фосфорилирование или димеризацию).

Обычно, если проводят диагностическое тестирование, может быть получен образец от пациента, нуждающегося в лечении. В том случае, когда у субъекта имеется злокачественная опухоль, образец обычно представляет собой образец опухоли. В предпочтительном варианте образец опухоли является образцом опухоли рака яичника, рака брюшины, рака фаллопиевых труб, метастатического рака молочной железы (MBC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака простаты или рака прямой и ободочной кишки.

Однако следует отметить, что в данной публикации описаны различные другие незлокачественные терапевтические показания для HER-антител. В том случае, когда пациента необходимо лечить по поводу таких незлокачественных показаний, от пациента может быть получен подходящий образец и подвергнут диагностическому анализу, как описано в данной публикации.

Биологический образец согласно изобретению может быть фиксированным образцом, например фиксированным в формалине, залитым в парафин образцом (FFPE) или замороженным образцом.

Согласно одному варианту настоящего изобретения пациент, отобранный для терапии, имеет опухоль, в которой наблюдается активация HER (и предпочтительно HER2). В одном варианте степень активации HER (или HER2) в злокачественных клетках значительно превышает уровень активации данного рецептора в незлокачественных клетках того же типа ткани. Такая избыточная активация может возникать в результате сверхэкспрессии рецептора HER и/или

больших, чем в норме, уровней лиганда HER, доступного для активации рецептора HER в злокачественных клетках. Такая чрезмерная активация может вызвать и/или вызвана злокачественным состоянием раковой клетки. В некоторых вариантах злокачественную опухоль можно подвергнуть диагностическому или прогностическому анализу, чтобы определить, происходит ли амплификация и/или сверхэкспрессия рецептора HER, которая приводит к такой чрезмерной активации рецептора HER. Альтернативно или дополнительно, злокачественная опухоль может быть подвергнута диагностическому или прогностическому анализу, чтобы определить происходит ли амплификация и/или сверхэкспрессия лиганда HER в злокачественной опухоли, которая вносит вклад в чрезмерную активацию рецептора. В подгруппе таких злокачественных опухолей избыточная активация рецептора может возникать в результате аутокринного пути стимуляции. Различные анализы для определения активации HER более подробно будут описаны ниже.

(i) Димеры HER

Образцы опухоли можно оценить в отношении присутствия HER-димеров, которые свидетельствуют об активации HER или HER2. Любой известный в данной области способ можно использовать для выявления димеров HER2, таких как EGFR-HER2, HER2-HER3, в опухолях. Несколько предпочтительных способов описаны ниже. Указанные способы выявляют нековалентные взаимодействия белок-белок или иным образом указывают о близком соседстве между представляющими интерес белками.

Способы, основанные на иммуноаффинности, такие как иммунопреципитация или ELISA, можно использовать для выявления димеров HER. В одном варианте HER2-антитела используют для иммунопреципитации комплексов, содержащих HER2, из опухолевых клеток и полученный в результате иммунопреципитат затем исследуют в отношении присутствия EGFR или HER3 иммуноблоттингом. В другом варианте антитела к EGFR или HER3 можно использовать для стадии иммунопреципитации, и иммунопреципитат затем исследуют с использованием HER2-антител. В другом варианте лиганды HER, специфичные по отношению к EGFR, HER3, комплексам EGFR/HER2 или комплексам HER2/HER3, можно использовать для преципитации комплексов, которые затем исследуют в отношении присутствия HER2. Например, лиганды можно конъюгировать с авидином и комплексы очистить на колонке с биотином.

В других вариантах, таких как ELISA или анализы антител типа «сэндвич», антитела к HER2 иммобилизуют на твердой подложке, подвергают контакту с опухолевыми клетками или лизатом опухолевых клеток, промывают и затем подвергают воздействию антитела против EGFR или HER3. Связывание последнего антитела, которое может быть выявлено непосредственно или с помощью второго антитела, конъюгированного с регистрируемой меткой, показывает наличие гетеродимеров. В некоторых вариантах иммобилизуют антитело к EGFR или HER3, а HER2-антитело используют для стадии выявления. В других вариантах лиганды HER могут быть использованы вместо или в комбинации с HER-антителами.

Химическое или вызванное УФ поперечное связывание также можно использовать для ковалентного связывания димеров на поверхности живых клеток. Hunter et al., Biochem. J., 320:847-53. Примеры химических поперечно связывающих агентов включают дитиобис(сукцинимидил)пропионат (DSP) и 3,3-дитиобис(сульфосукцинимидил)пропионат (DTSSP). В одном варианте клеточные экстракты опухолевых клеток с химическим поперечным связыванием анализируют в SDS-ПААГ и подвергают иммуноблоттингу с использованием антител к EGFR

и/или HER3. Полоса, имеющая сильный сдвиг, с подходящей молекулярной массой наиболее вероятно представляет димеры EGFR-HER2 или HER2-HER3, так как HER2 является предпочтительным партнером при димеризации для EGFR и HER3.

Полученный результат можно подтвердить последующим иммуноблоттингом с HER2-антителами.

Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) также можно использовать для выявления димеров EGFR-HER2 или HER2-HER3. FRET выявляет конформационные изменения белков и белок-белковые взаимодействия *in vivo* и *in vitro* на основе переноса энергии от донорного флуорофора на акцепторный флуорофор. Selvin, Nat. Struct. Biol. 7:730-34 (2000). Перенос энергии имеет место, только если донорный флуорофор находится достаточно близко к акцепторному флуорофору. В типичном FRET-эксперименте два белка или два участка на одном белке метят разными флуоресцентными зондами. Один из зондов, донорный зонд, возбуждают до более высокого энергетического состояния падающим светом конкретной длины волны. Затем донорный зонд отдает свою энергию второму зонду, акцепторному зонду, приводя к снижению интенсивности флуоресценции донора и увеличению испусканию флуоресценции акцептора. Чтобы измерить степень переноса энергии, интенсивность донора в образце, меченном донорным и акцепторным зондами, сравнивают с интенсивностью в образце, меченном только донорным зондом. Необязательно интенсивность акцептора сравнивают в образцах, меченных донором/акцептором и только акцептором. Подходящие зонды известны в данной области и включают, например, проникающие через мембраны красители, такие как флуоресцеин и родамин, органические красители, такие как цианиновые красители, и атомы лантанидов. Selvin, *выше*. Способы и оборудование для выявления и измерения переноса энергии также известны в данной области. Selvin, *выше*.

Основанные на FRET способы, подходящие для выявления и измерения белок-белковых взаимодействий в отдельных клетках, также известны в данной области. Например, можно использовать микроскопию на основе резонансного переноса энергии флуоресценции с фотообесцвечиванием донора (pbFRET) и флуоресцентную микроскопию с отображением времени жизни (FLIM), чтобы выявить димеризацию рецепторов на клеточной поверхности. Selvin, *выше*; Gadella and Jovin, J. Cell Biol., 129:1543-58 (1995). В одном варианте pbFRET используют на клетках либо «в суспензии», либо «*in situ*», чтобы выявить или измерить образование димеров EGFR-HER2 или HER2-HER3, как описано в Nagy et al., Cytometry, 32:120-131 (1998). Указанными способами измеряют уменьшение времени жизни флуоресценции донора вследствие переноса энергии. В конкретном варианте можно использовать проточно-цитометрический способ FRET типа Ферстера (FCET) для исследования димеризации EGFR-HER2 и HER2-HER3, как описано в Nagy et al., *выше*, и Brockhoff et al., Cytometry, 44:338-48 (2001).

FRET предпочтительно используют вместе со стандартными способами иммуногистохимического мечения. Kenworthy, Methods, 24:289-96 (2001). Например, антитела, конъюгированные с подходящими флуоресцентными красителями, можно использовать в качестве зондов для мечения двух разных белков. Если белки находятся в тесной близости друг к другу, то флуоресцентные красители действуют как доноры и акцепторы для FRET. Перенос энергии выявляют стандартными способами. Перенос энергии можно выявлять способами проточной цитометрии или с помощью систем цифровой микроскопии, таких как конфокальная микроскопия или микроскопия с использованием широкопольного флуоресцентного микроскопа,

соединенного с камерой на базе приборов с зарядовой связью (CCD).

В одном варианте настоящего изобретения HER2-антитела и антитела либо к EGFR, либо к HER3 непосредственно метят двумя разными флуорофорами, например, как описано в Nagy et al., *выше*. Опухолевые клетки или лизаты опухолевых клеток подвергают контакту с дифференциально мечеными антителами, которые действуют как доноры и акцепторы для FRET в присутствии димеров EGFR-HER2 или HER2-HER3. Альтернативно, немеченые антитела против HER2 и против либо EGFR, либо HER3 используют вместе с дифференциально мечеными вторыми антителами, которые служат в качестве доноров и акцепторов. См., например, Brockhoff et al., *выше*. Выявляют перенос энергии и определяют присутствие димеров, если метки оказываются в тесной близости.

В других экспериментах лиганды рецептора HER, которые являются специфичными по отношению к HER2 и либо к HER1, либо к HER3, флуоресцентно метят и используют в исследованиях FRET.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения присутствие димеров на поверхности опухолевых клеток демонстрируют по совместной локализации HER2 либо с EGFR, либо с HER3, используя стандартные прямые или опосредованные иммунофлуоресцентные способы и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию. Альтернативно используют лазерную сканирующую визуализацию (LSI), чтобы выявить связывание антитела и совместную локализацию HER2 либо с EGFR, либо с HER3, в высокопроизводительном формате, например, с использованием планшета для микротитрования, как описано в Zuck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11122-27 (1999).

В следующих вариантах присутствие димеров EGFR-HER2 и/или HER2-HER3 определяют путем идентификации ферментативной активности, которая зависит от близости компонентов в димере. HER2-антитело конъюгируют с одним ферментом, а антитело к EGFR или к HER3 конъюгируют со вторым ферментом. Добавляют первый субстрат для первого фермента, и реакция дает второй субстрат для второго фермента. Это приводит к взаимодействию с другой молекулой с образованием регистрируемого соединения, такого как краситель. Присутствие другого химического соединения разрушает второй субстрат, так что реакция со вторым ферментом предотвращается, если первый и второй ферменты, и следовательно, два антитела, не находятся в тесной близости. В конкретном варианте опухолевые клетки или клеточные лизаты подвергают контакту с HER2-антителом, которое конъюгируют с глюкозооксидазой, и антителом к HER3 или к HER1, которое конъюгируют с пероксидазой хрена. В реакционную смесь добавляют глюкозу вместе с предшественником красителя, таким как DAB, и каталазой. Присутствие димеров определяют по развитию окраски при окрашивании DAB.

Димеры также можно выявлять с использованием способов, основанных на системе анализа eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif.), которые описаны, например, в заявке на выдачу патента США 2001/0049105, опубликованной 6 декабря 2001, которая специально включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. eTag™ или «электрофоретическая метка» содержит регистрируемый репортерный компонент, такой как флуоресцентная группа. Она также содержит «модификатор подвижности», который состоит по существу из компонента, имеющего уникальную электрофоретическую подвижность. Такие компоненты позволяют отделять и выявлять eTag™ в сложной смеси в определенных электрофоретических условиях, таких как капиллярный электрофорез (CE). Часть eTag™, содержащую репортерный

компонент и необязательно модификатор подвижности, связывают с первым связывающим мишень компонентом с помощью расщепляемой связывающей группы, получая первое связывающее соединение. Первый связывающий мишень компонент специфично распознает конкретную первую мишень, такую как нуклеиновая кислота

или белок. Первый связывающий мишень компонент никоим образом не ограничен и может, например, представлять собой полинуклеотид или полипептид. Предпочтительно первым связывающим мишень компонентом является антитело или фрагмент антитела. Альтернативно, первым связывающим мишень компонентом

может быть лиганд рецептора HER или его компетентный в связывании фрагмент. Связывающая группа предпочтительно содержит расщепляемый остаток, такой как ферментный субстрат или любая химическая связь, которая может расщепляться в определенных условиях. Когда первый связывающий мишень компонент связывается со своей мишенью, вводят и/или активируют расщепляющий агент и связывающую группу расщепляют, тем самым высвобождая часть eTagTM, содержащую репортерный компонент и модификатор подвижности. Таким образом, присутствие «свободного» eTagTM свидетельствует о связывании связывающего мишень компонента с его мишенью.

Предпочтительно второе связывающее соединение содержит расщепляющий агент и второй связывающий мишень компонент, который специфично распознает вторую мишень. Второй связывающий мишень компонент также никоим образом не ограничен и может представлять собой, например, антитело, или фрагмент антитела, или лиганд рецептора HER, или компетентный в связывании фрагмент лиганда.

Расщепляющий агент является таким, что он будет расщеплять только связывающую группу в первом связывающем соединении, если первое связывающее соединение и второе связывающее соединение находятся в тесной близости.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первое связывающее соединение содержит eTagTM, в которой антитело к HER2 служит в качестве первого связывающего мишень компонента. Второе связывающее соединение содержит антитело к EGFR или HER3, связанное с расщепляющим агентом, способным расщеплять связывающую группу eTagTM. Предпочтительно расщепляющий агент должен быть активирован, чтобы быть способным расщеплять связывающую группу. Опухолевые клетки или лизаты опухолевых клеток подвергают контакту с eTagTM, которая связывается с HER2, и с модифицированным антителом к EGFR или к HER3, которое связывается с EGFR или HER3 на клеточной поверхности. Не связанное связывающее соединение предпочтительно удаляют и расщепляющий агент при необходимости активируют. Если присутствуют димеры EGFR-HER2 или HER2-HER3, расщепляющий агент будет расщеплять связывающую группу и высвобождать eTagTM благодаря близости расщепляющего агента и связывающей группы. Затем свободную eTagTM можно выявить любым способом, известным в данной области, таким как капиллярный электрофорез.

В одном варианте расщепляющий агент является активируемым видом химической молекулы, которая действует на связывающую группу. Например, расщепляющий агент может быть активирован воздействием света на образец.

В другом варианте eTagTM конструируют с использованием антитела к EGFR или HER3 в качестве первого связывающего мишень компонента, а второе связывающее соединение конструируют на основе антитела к HER2.

В еще одном варианте димер HER выявляют с использованием антитела или другого реагента, который специфично или предпочтительно связывается с димером

по сравнению с его связыванием с любым рецептором HER в димере.

(ii) Фосфорилирование HER2

После иммунопреципитации с использованием антитела к EGFR, HER2 или HER3, которая обсуждается в предыдущем разделе, необязательно может следовать функциональный анализ в отношении димеров в качестве альтернативы или добавления к иммуноблоттингу. В одном варианте после иммунопреципитации HER3-антителом следует анализ в отношении активности рецепторной тирозинкиназы в иммунопреципитате. Поскольку HER3 не имеет присущей ему тирозинкиназной активности, присутствие тирозинкиназной активности в продукте иммунопреципитации свидетельствует, что HER3 наиболее вероятно связан с HER2. Graus-Porta et al., EMBO J., 16:1647-55 (1997); Klapper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4995-5000 (1999). Полученный результат можно подтвердить иммуноблоттингом с HER2-антителами. В другом варианте после иммунопреципитации HER2-антителом следует анализ в отношении тирозинкиназной активности рецептора EGFR. В данном анализе продукт иммунопреципитации подвергают контакту с радиоактивным АТР и пептидным субстратом, который имитирует сайт трансфосфорилирования HER2 рецептором EGFR *in vivo*. Фосфорилирование пептида свидетельствует о совместной иммунопреципитации и, следовательно, димеризации EGFR с HER2. Анализы рецепторной тирозинкиназной активности хорошо известны в данной области и включают анализы, в которых выявляют фосфорилирование субстратов-мишеней, например, с использованием антитела к фосфотирозину, и активацию родственных путей сигнальной трансдукции, таких как путь MAPK.

Фосфорилирование рецептора HER можно оценивать иммунопреципитацией одного или нескольких рецепторов HER, таких как рецептор HER2, и Вестерн-блот-анализом. Например, позитивность определяют по наличию полосы фосфо-HER2 в геле, используя антитело против фосфотирозина, чтобы выявить фосфорилированный остаток(ки) тирозина в иммунопреципитированном рецепторе(ах) HER. Антитела против фосфотирозина коммерчески доступны от PanVera (Madison, Wis.), дочерней компании Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA), или от Upstate Biotechnology (Lake Placid, N.Y.). Негативность определяют по отсутствию полосы.

В другом варианте фосфорилирование рецептора HER2 (HER2) оценивают иммуногистохимически, используя антитела, специфичные к фосфо-HER2 (клон PN2A; Thor et al., J. Clin. Oncol, 18(18):3230-3239 (2000)).

Другие способы выявления фосфорилирования рецептора(ов) HER включают, без ограничения, ELISA KIRA (патенты США №№5766863, 5891650, 5914237, 6025145 и 6287784), масс-спектрометрию (сравнивающую размер фосфорилированного и нефосфорилированного HER2) и анализ близости e-tag с использованием как антитела к HER (например HER2), так и антитела, фосфоспецифичного или специфичного к фосфотирозину (например, используя набор для анализа eTag™, доступный от Aclara BioSciences (Mountain View, CA)). Подробности анализа eTag описаны выше.

Также можно использовать фосфоспецифичные антитела в клеточной матрице, чтобы выявить статус фосфорилирования белка сигнальной трансдукции в клеточном образце (US2003/0190689).

(iii) Профиль генной экспрессии

В одном варианте анализы экспрессии генов могут служить в качестве заменителей измерения фосфорилирования HER или непосредственно активации. Такие анализы особенно применимы в том случае, когда образец представляет собой фиксированный образец (например, залитый в парафин, фиксированный формалином образец

опухоли), на котором может быть затруднительно достоверно количественно определить фосфорилирование HER. Согласно данному способу оценивают экспрессию двух или более рецепторов HER и одного или нескольких лигандов HER в образце, при этом экспрессия двух или более рецепторов HER и одного или нескольких лигандов HER свидетельствует о позитивном фосфорилировании или активации HER в образце. В одном варианте указанного способа можно измерить экспрессию бетацеллюлина и/или амфирегулина в образце, при этом экспрессии бетацеллюлина и/или амфирегулина свидетельствует о позитивном фосфорилировании или активации HER в образце.

Согласно данному способу образец от пациента тестируют в отношении экспрессии двух или более рецепторов HER (предпочтительно выбранных из EGFR, HER2 и HER3) и одного или нескольких лигандов HER (предпочтительно выбранных из бетацеллюлина, амфирегулина, эпирегулина и TGF- α , наиболее предпочтительно бетацеллюлина или амфирегулина). Например, два или более рецепторов HER могут представлять собой EGFR и HER2 или HER2 и HER3. Предпочтительно определяют экспрессию HER2 и EGFR или HER3, а также бетацеллюлина или амфирегулина. Образец можно тестировать в отношении экспрессии бетацеллюлина или амфирегулина отдельно или в комбинации с тестированием экспрессии двух или более рецепторов HER. Позитивная экспрессия идентифицированного гена(ов) свидетельствует о том, что пациент является кандидатом на лечение HER-антителом, таким как пертузумаб. Кроме того, позитивная экспрессия гена(ов) свидетельствует, что пациент с большей вероятностью благоприятно будет отвечать на терапию HER-антителом, чем пациент, у которого нет такой позитивной экспрессии.

Различные способы определения экспрессии мРНК или белка включают, без ограничения, определение профиля экспрессии генов, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), включая количественную ПЦР в режиме реального времени (qRT-ПЦР), анализ микрочипов, периодический анализ экспрессии генов (SAGE), MassARRAY, анализ экспрессии генов с использованием массового параллельного секвенирования идентифицирующих фрагментов (MPSS), протеомику, иммуногистохимию (ИНС) и т.д. Предпочтительно оценивают количественно мРНК. Такой анализ мРНК предпочтительно осуществляют, используя способ полимеразной цепной реакции (ПЦР) или анализ микрочипов. В том случае, когда используют ПЦР, предпочтительной формой ПЦР является количественная ПЦР в режиме реального времени (qRT-ПЦР). В одном варианте экспрессию одного или нескольких указанных выше генов считают позитивной экспрессией, если она имеет медианное значение или выше, например, по сравнению с другими образцами такого же типа опухолей. Медианный уровень экспрессии можно определять по существу одновременно с измерением генной экспрессии или можно определить предварительно.

Существуют различные типичные способы определения экспрессии генов. Стадии типичного протокола определения профиля экспрессии генов с использованием фиксированных, залитых в парафин тканей в качестве источника РНК, включая выделение мРНК, очистку, удлинение праймера и амплификацию, приведены в различных опубликованных журнальных статьях (например, Godfrey et al., J. Molec. Diagnostics 2:84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol. 158:419-29 (2001)). Кратко, типичный способ начинается с нарезания срезов толщиной около 10 микрометров залитых в парафин образцов опухолевой ткани. Затем экстрагируют РНК, а белок и ДНК удаляют. После анализа концентрации РНК, при необходимости, могут быть включены стадии репарации и/или амплификации РНК, и РНК подвергают обратной

транскрипции с использованием специфичных для генов промоторов с последующей ПЦР. Наконец, анализируют данные, чтобы идентифицировать наилучший вариант (варианты) лечения, доступного для пациента, на основе характерной картины экспрессии генов, идентифицированной в исследуемом образце опухоли.

(iv) Экспрессия и амплификация HER

Чтобы определить экспрессию или амплификацию HER в злокачественной опухоли, имеются различные диагностические/прогностические анализы. В одном варианте сверхэкспрессию HER можно анализировать с помощью ИНС, используя, например, HERCEPTEST® (Dako). Залитые в парафин срезы ткани из биопсии опухоли могут быть подвергнуты ИНС-анализу и оценены в соответствии с критериями интенсивности окрашивания белка HER2 следующим образом:

оценка 0, окрашивание не наблюдается или наблюдается окрашивание мембраны менее чем в 10% опухолевых клеток;

оценка 1+, выявляют слабое/едва различимое окрашивание мембраны более чем в 10% опухолевых клеток. В клетках окрашивается только часть их мембраны;

оценка 2+, наблюдают полное окрашивание мембраны в степени от слабой до средней более чем в 10% опухолевых клеток;

оценка 3+, наблюдают полное окрашивание мембраны в степени от средней до сильной более чем в 10% опухолевых клеток.

Опухоли с оценками 0 или 1+ в случае оценивания сверхэкспрессии HER2 можно охарактеризовать как опухоли, не сверхэкспрессирующие HER2, тогда как опухоли с оценками 2+ или 3+ можно охарактеризовать как опухоли, сверхэкспрессирующие HER2.

Опухоли, сверхэкспрессирующие HER2, могут быть оценены с использованием иммуногистохимических оценок, которые соответствуют количеству копий молекул HER2, экспрессируемых на клетку, и которые могут быть определены биохимически:

0 = 0-10000 копий/клетку,

1+ = по меньшей мере примерно 200000 копий/клетку,

2+ = по меньшей мере примерно 500000 копий/клетку,

3+ = по меньшей мере примерно 2000000 копий/клетку.

Сверхэкспрессия HER2 на уровне 3+, которая приводит к независимой от лиганда активации тирозинкиназы (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)), происходит примерно в 30% злокачественных опухолей молочной железы, и у таких пациентов снижается выживаемость без рецидивов и общая выживаемость (Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989); Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987)).

Альтернативно или дополнительно, FISH-анализы, такие как INFORM™ (предоставляемый Ventana, Ariz.) или PATHVISION™ (Vysis, Illinois), могут быть осуществлены на фиксированной формалином, залитой в парафин ткани опухоли, чтобы определить степень амплификации HER2 (если это имеет место) в опухоли.

В одном варианте злокачественная опухоль будет представлять собой опухоль, которая экспрессирует (и может сверхэкспрессировать) EGFR, такую экспрессию можно оценить, как и в случае способов оценки экспрессии HER2, указанных выше.

Сверхэкспрессию или амплификацию рецептора HER или лиганда HER также можно оценить с использованием диагностического анализа *in vivo*, например, введением молекулы (такой как антитело), которая связывает молекулу, которую необходимо выявить, и которая помечена регистрируемой меткой (например, радиоактивным изотопом), и внешним сканированием пациента для локализации

метки.

IV Фармацевтические препараты

Терапевтические препараты антител, используемых согласно настоящему изобретению, готовят для хранения смешиванием антитела, имеющего требуемую 5 степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для 10 реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как 15 метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, 20 аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твин, 25 плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Лиофилизированные препараты антител описаны в WO 97/04801, специально включенной в данное описание в виде ссылки.

Предпочтительный препарат пертузумаба для терапевтического применения содержит 30 мг/мл пертузумаба в 20 mM растворе ацетата гистидина, 120 mM 30 сахарозы, 0,02% полисорбата 20, pH 6,0. Альтернативный препарат пертузумаба содержит 25 мг/мл пертузумаба, 10 mM буфер гистидин-HCl, 240 mM сахарозу, 0,02% полисорбат 20, pH 6,0.

Препарат согласно изобретению при необходимости также может содержать более 35 одного активного соединения для конкретного показания к лечению, предпочтительно соединения с комплементарными активностями, которые не оказывают друг на друга неблагоприятного воздействия. Различные лекарственные средства, которые можно комбинировать с HER-антителом, описаны в приведенном 40 ниже разделе, посвященном способу лечения. Такие молекулы соответствующим образом вводят в комбинацию в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способами коацервации или межфазной полимеризацией, 45 например микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th 50 edition, Osol, A., Ed., (1980).

Могут быть приготовлены препараты длительного высвобождения. Подходящие примеры препаратов длительного высвобождения включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, и такие матрицы

имеют определенную форму, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц для длительного высвобождения включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США №3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, не разрушаемый этилен-винилацетат, разрушаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Препараты, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществить фильтрованием через стерильные фильтрующие мембраны.

V Лечение и дозирование HER-антител

Примеры различных злокачественных опухолей, которые можно лечить фиксированной дозой HER-антитела, перечислены в разделе «Определения» выше.

Предпочтительные для лечения злокачественные опухоли включают рак яичника; рак брюшины; рак фаллопиевых труб; рак молочной железы, включая метастатический рак молочной железы (MBC); рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC); рак простаты; рак прямой и ободочной кишки и/или злокачественную опухоль, в которой наблюдается экспрессия, амплификация и/или активация HER. В одном варианте злокачественная опухоль, которую подвергают лечению, представляет собой резистентную к терапии злокачественную опухоль или резистентную к платине злокачественную опухоль. Введение фиксированной дозы (доз) антитела будет приводить к ослаблению признаков или симптомов злокачественной опухоли.

Помимо злокачественной опухоли, фиксированную дозу (дозы) HER-антител, которые описаны в данной публикации, можно использовать для лечения различных незлокачественных заболеваний или расстройств. Такие незлокачественные заболевания или расстройства включают аутоиммунное заболевание (например, псориаз; см. определение выше); эндометриоз; склеродерму; рестеноз; полипы, такие как полипы ободочной кишки, полипы носа или полипы желудочно-кишечного тракта; фиброаденому; респираторное заболевание (см. определение выше); холецистит; неврофиброматоз; поликистоз почек; воспалительные заболевания; заболевания кожи, включая псориаз и дерматит; сосудистое заболевание (см. определение выше); состояния, в которые вовлечена аномальная пролиферация эпителиальных клеток сосудов; язвы желудочно-кишечного тракта; болезнь Менетрие, секретирующие аденомы или синдром потери белка; почечные расстройства; ангиогенные расстройства; заболевание глаз, такое как связанная с возрастом дегенерация желтого пятна, синдром предполагаемого гистоплазмоза глаз, неоваскуляризацию сетчатки в результате пролиферативной диабетической ретинопатии, васкуляризацию сетчатки, диабетическую ретинопатию или возрастную дегенерацию желтого пятна; связанные с костями патологии, такие как остеоартрит, рахит и остеопороз; повреждение после ишемии головного мозга; фиброзные или связанные с отеками заболевания, такие как цирроз печени, легочный фиброз, саркоидоз, тиреоидит, системный синдром повышенной вязкости, болезнь Рандю-Вебера-Ослера, хроническое окклюзионное заболевание легких, или отек после ожогов, травмы, излучения, инсульта, гипоксии или ишемии; реакцию гиперчувствительности кожи; диабетическую ретинопатию и диабетическую нефропатию; синдром Гийена-Барре; болезнь «трансплантат против хозяина» или отторжение трансплантата; болезнь Педжета; воспаление костей и суставов;

фотостарение (например, вызванное УФ-излучением старение кожи человека); доброкачественную гипертрофию простаты; некоторые микробные инфекции, включая микробные патогены, выбранные из аденовируса, хантавирусов, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp.* и *Bordetella pertussis*; тромб, вызванный агрегацией тромбоцитов; репродуктивные состояния, такие как эндометриоз, синдром гиперстимуляции яичников, предэклампсию, дисфункциональное маточное кровотечение или менометроррагию; синовит; атерому; острые и хронические нефропатии (включая пролиферативный гломерулонефрит и вызванное диабетом заболевание почек); экзему; образование гипертрофических рубцов; эндотоксический шок и грибковую инфекцию; семейный аденоматозный полипоз; нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, связанная со СПИДом деменция, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, пигментная дегенерация сетчатки, спинальная мышечная атрофия и дегенерация мозжечка); миелодиспластические синдромы; апластическую анемию; ишемическое повреждение; фиброз легкого, почки или печени; опосредованную Т-клетками реакцию гиперчувствительности; гипертрофический пилоростеноз новорожденных; синдром обструкции мочевых путей; псориатический артрит и тиреоидит Хашимото.

Предпочтительные незлокачественные показания для терапии согласно изобретению включают псориаз, эндометриоз, склеродерму, сосудистое заболевание (например, рестеноз, артериосклероз, болезнь коронарных артерий или гипертонию), полипы ободочной кишки, фиброаденому или респираторное заболевание (например, астму, хронический бронхит, бронхоэктаз или кистозный фиброз).

HER-антитело вводят больному человеку в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например, в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутриспинальный, подкожный, внутрисуставной, интрасиновиальный, интратекальный, пероральный, местный или ингаляционный пути. Предпочтительным является внутривенное введение антитела.

Для профилактики или лечения заболевания фиксированная доза HER-антитела будет зависеть от типа заболевания, подвергаемого лечению, определенного выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело и решения лечащего врача. Фиксированную дозу соответствующим образом вводят пациенту один раз или в ходе серии введений. Предпочтительно фиксированная доза составляет примерно от 20 мг до 2000 мг HER-антитела. Например, фиксированная доза может составлять примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг или примерно 1050 мг HER-антитела.

В том случае, когда вводят серию фиксированных доз, их можно вводить, например, примерно один раз в неделю, примерно один раз в 2 недели, примерно один раз в 3 недели или примерно один раз в 4 недели, но предпочтительно примерно один раз в 3 недели. Фиксированные дозы можно продолжать вводить, например, до тех пор, пока не будет прогрессирования заболевания, нежелательного явления, или в течение другого периода, который определяется лечащим врачом. Например, можно вводить примерно от двух, трех или четырех доз вплоть до примерно 17 или более фиксированных доз.

В одном варианте вводят одну или несколько ударных доз антитела с последующими одной или несколькими поддерживающими дозами антитела. В другом варианте пациенту вводят множество одинаковых фиксированных доз.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления изобретения вводят фиксированную дозу HER-антитела (например, пертузумаба), составляющую примерно 840 мг (ударная доза), затем одну или несколько доз примерно по 420 мг (поддерживающая доза (дозы)) антитела. Поддерживающие дозы предпочтительно вводят примерно один раз в 3 недели, всего по меньшей мере две дозы, вплоть до 17 или более доз.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения вводят одну или несколько фиксированных доз, составляющих примерно 1050 мг HER-антитела (например, пертузумаба), например, один раз в 3 недели. Согласно данному варианту вводят одну, две или более фиксированных доз, например, в течение времени до одного года (17 циклов) и, при необходимости, в течение более длительного периода.

В другом варианте вводят фиксированную дозу, составляющую примерно 1050 мг HER2-антитела (например, пертузумаба) в качестве ударной дозы с последующим введением одной или нескольких поддерживающих доз, составляющих примерно 525 мг антитела. Согласно данному варианту одну, две или более поддерживающих доз можно вводить пациенту один раз в 3 недели.

Таким образом, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли больного человека, включающему в себя введение пациенту по меньшей мере одной фиксированной дозы пертузумаба, при этом фиксированная доза составляет примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг или примерно 1050 мг пертузумаба.

В том случае, когда заболеванием является злокачественная опухоль, пациента предпочтительно лечат с использованием комбинации HER-антитела и одного или нескольких химиотерапевтических средств. Предпочтительно по меньшей мере одним из химиотерапевтических средств является антиметаболитное химиотерапевтическое средство, такое как гемцитабин. Комбинированное введение включает совместное введение или одновременное введение с использованием отдельных препаратов или одного фармацевтического препарата и последовательное введение в любом порядке, при этом предпочтительно существует период времени, в течение которого оба (или все) активные агенты одновременно проявляют свои биологические активности.

Таким образом, антиметаболитное химиотерапевтическое средство можно вводить перед или после введения HER-антитела. В данном варианте промежуток времени между по меньшей мере одним введением антиметаболитного химиотерапевтического средства и по меньшей мере одним введением HER-антитела предпочтительно составляет примерно 1 месяц или меньше, наиболее предпочтительно примерно 2 недели или меньше. Альтернативно, антиметаболитное химиотерапевтическое средство и HER-антитело вводят пациенту одновременно в одном препарате или в отдельных препаратах. Лечение комбинацией химиотерапевтического средства (например, антиметаболитного химиотерапевтического средства, такого как гемцитабин) и HER-антитела (например, пертузумаба) может приводить к синергичному или более чем аддитивному терапевтическому эффекту у пациента.

Если вводят антиметаболитное химиотерапевтическое средство, то его обычно вводят в известных для него дозах или необязательно пониженных дозах вследствие комбинированного действия лекарственных средств или отрицательных побочных эффектов, которые можно отнести к введению антиметаболитного химиотерапевтического средства. Приготовление и схемы дозирования в случае таких химиотерапевтических средств можно использовать согласно инструкциям

производителя или как определено эмпирически лечащим врачом. В том случае, когда антиметаболитным химиотерапевтическим средством является гемцитабин, его предпочтительно вводят в дозе примерно от 600 мг/м² до 1250 мг/м² (например, примерно 1000 мг/м²), например, в 1 и 8 дни 3-недельного цикла.

Помимо HER-антитела и антиметаболитного химиотерапевтического средства, с ними можно комбинировать другие терапевтические схемы. Например, можно вводить второе (третье, четвертое и т.д.) химиотерапевтическое средство(ва), при этом второе химиотерапевтическое средство либо является другим, отличающимся антиметаболитным химиотерапевтическим средством, либо химиотерапевтическим средством, которое не является антиметаболитом. Например, вторым химиотерапевтическим средством может быть таксан (такой как паклитаксел или доцетаксел), капецитабин или основанное на платине химиотерапевтическое средство (такое как карбоплатин, цисплатин или оксалиплатин), антрациклин (такой как доксорубицин, включая липосомный доксорубицин), топотекан, пеметрексед, алкалоид барвинка (такой как винорелбин) и TLK 286. Можно вводить «коктейли» разных химиотерапевтических средств.

Другие терапевтические средства, которые можно комбинировать с HER-антителом, включают любое одно или несколько из следующих средств: второе отличающееся HER-антитело (например, ингибирующее рост HER2-антитело, такое как трастузумаб, или HER2-антитело, которое индуцирует апоптоз HER2-сверхэкспрессирующей клетки, такое как 7C2, 7F3 или их гуманизированные варианты); антитело, направленное против другого связанного с опухолью антигена, такого как EGFR, HER3, HER4; антигормональное соединение, например антиэстрогенное соединение, такое как тамоксифен или ингибитор ароматазы; кардиопротектор (чтобы предотвратить или уменьшить любую дисфункцию миокарда, связанную с терапией); цитокин; направленное к EGFR лекарственное средство (такое как TARCEVAO®, IRESSA® или цетуксимаб); антиангиогенное средство (особенно бевацизумаб, продаваемый Genentech под торговой маркой AVASTIN™); ингибитор тирозинкиназы; ингибитор ЦОГ (например, ингибитор ЦОГ-1 или ЦОГ-2); нестероидное противовоспалительное лекарственное средство, целекоксиб (CELEBREX®); ингибитор фарнезилтрансферазы (например, типифарниб/ZARNESTRA® R115777, доступный от Johnson and Johnson, или лонафарниб SCH66336, доступный от Schering-Plough); антитело, которое связывает онкофетальный белок CA 125, такое как ореговомаб (MoAb B43.13); HER2-вакцину (такую как HER2-вакцина AutoVac от Pharmexia, или вакцина на основе белка APC8024 от Dendreon, или вакцина на основе HER2-пептида от GSK/Corixa); другую направленную к HER терапию (например, трастузумаб, цетуксимаб, гефитиниб, эрлотиниб, C11033, GW2016 и т.д.); Raf и/или gas-ингибитор (см., например, WO 2003/86467); инъекцию липосомного доксорубицина гидрохлорида (DOXIL®); ингибитор топоизомеразы I, такой как топотекан; таксан; двойной ингибитор тирозинкиназы HER2 и EGFR, такой как лапатиниб/GW572016; TLK286 (TELCYTA®); EMD-7200; лекарственное средство для лечения тошноты, такое как антагонист серотонина, стероид или бензодиазепин; лекарственное средство для профилактики или лечения сыпи на коже или стандартные средства против акне, включая местный или пероральный антибиотик; лекарственное средство, понижающее температуру тела, такое как ацетаминофен, дифенгидрамин или меперидин; гематопозитический фактор роста и т.д.

Подходящими дозами любого из указанных выше совместно вводимых средств

являются дозы, используемые в настоящее время, и они могут быть снижены благодаря комбинированному действию (синергии) средства и HER-антитела.

Кроме указанных выше терапевтических схем, пациент может быть подвергнут хирургическому удалению злокачественных клеток и/или лучевой терапии.

Предпочтительно, вводимое антитело является «голым» антителом. Однако вводимое антитело можно конъюгировать с цитотоксическим средством. Предпочтительно, иммуноконъюгат и/или антиген, с которым он связывается, интернализуется клеткой, приводя к повышенной терапевтической эффективности иммуноконъюгата в гибели злокачественной клетки, с которой он связывается. В предпочтительном варианте цитотоксическое средство поражает или влияет на нуклеиновую кислоту в злокачественной клетке. Примеры таких цитотоксических средств включают мейтанзиноиды, калихеамицины, рибонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы.

Помимо введения пациенту антитела в виде белка, настоящая заявка относится к введению антитела или белкового ингибитора с использованием генной терапии. См., например, заявку WO 96/07321, опубликованную 14 марта 1996, касающуюся применения генной терапии для создания внутриклеточных антител.

Существует два основных подхода для доставки нуклеиновой кислоты (необязательно находящейся в векторе) в клетки пациента: *in vivo* и *ex vivo*. Для доставки *in vivo* нуклеиновую кислоту инъецируют непосредственно пациенту, обычно в то место, где требуется антитело. Для лечения *ex vivo* клетки пациента извлекают, нуклеиновую кислоту вводят в эти изолированные клетки и модифицированные клетки вводят пациенту либо непосредственно, либо, например, инкапсулированными в пористые мембраны, которые имплантируют в организм пациента (см., например, патенты США №№4892538 и 5283187). Существует множество способов введения нуклеиновых кислот в живые клетки. Способы варьируют в зависимости от того, переносят ли нуклеиновую кислоту в культивируемые клетки *in vitro* или *in vivo* в клетки предполагаемого хозяина. Способы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*, включают применение липосом, электропорации, микроинъекции, слияния клеток, DEAE-декстрана, способа преципитации фосфатом кальция и т.д. Широко используемым вектором для доставки гена *ex vivo* является ретровирус.

Предпочтительные в настоящее время способы переноса нуклеиновых кислот *in vivo* включают трансфекцию вирусными векторами (такими как аденовирус, вирус простого герпеса I или аденоассоциированный вирус) и основанные на липидах системы (применимыми липидами для опосредованного липидами переноса генов являются, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). В некоторых ситуациях желательно снабдить источник нуклеиновой кислоты агентом, который нацелен на клетки-мишени, таким как антитело, специфичное по отношению к мембранному белку клеточной поверхности или к клетке-мишени, лиганд рецептора на клетке-мишени и т.д. В случае применения липосом, для направления к мишени и/или облегчения поглощения можно использовать белки, которые связываются с мембранным белком клеточной поверхности, связанным с эндоцитозом, например капсидными белками или их фрагментами, тропными по отношению к конкретному типу клеток, антителами к белкам, которые подвергаются интернализации в клеточном цикле, и белками, которые нацелены на внутриклеточную локализацию и увеличивают время полужизни внутри клеток. Способ опосредованного рецептором эндоцитоза описан, например, Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); и Wagner et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Для обзора известных в настоящее время протоколов мечения генов и генной терапии см. Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). См. также WO 93/25673 и цитированные в данной заявке ссылки.

VI Изделия производства

В другом варианте осуществления изобретения предлагается изделие производства, содержащее материалы, применимые для лечения злокачественной опухоли или других расстройств, описанных выше. Изделие производства содержит флакон с находящейся в нем фиксированной дозой HER-антитела и необязательно вкладыш в упаковку. Флакон может быть изготовлен из множества материалов, таких как стекло или пластмасса, и может быть герметично закрыт пробкой, прокалываемой шприцем. Например, флакон может представлять собой флакон из стекла Vitrum типа I (например, флакон объемом 20 см³ для фиксированной дозы 420 мг или флакон объемом 50 см³ для фиксированной дозы 1050 мг) с пробкой, ламинированной флуоресцентной смолой DAIKYO GREY™, и 20 мм алюминиевой крышкой с защелкой. Изделие производства может дополнительно содержать другие материалы, требуемые с коммерческой точки зрения или с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, наполнители, иглы и шприцы и т.д.

В предпочтительном варианте изделие производства включает флакон, содержащий фиксированную дозу HER-антитела (например, пертузумаба), где фиксированная доза составляет примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг или примерно 1050 мг HER-антитела.

Изделие производства предпочтительно дополнительно включает вкладыш в упаковку. Вкладыш в упаковку может содержать инструкции по введению фиксированной дозы онкологическому пациенту, включая, без ограничения, пациента с раком яичника, раком брюшины, раком фаллопиевых труб, метастатическим раком молочной железы (МБС), немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), раком простаты, раком прямой и ободочной кишки, и/или по введению фиксированной дозы онкологическому пациенту, у которого в злокачественной опухоли наблюдается экспрессия, амплификация и/или фосфорилирование HER.

В одном варианте изделие производства включает два флакона, при этом первый флакон содержит фиксированную дозу, составляющую примерно 840 мг пертузумаба, а второй флакон содержит фиксированную дозу, составляющую примерно 420 мг пертузумаба.

В другом варианте изделие производства включает два флакона, при этом первый флакон содержит фиксированную дозу, составляющую примерно 1050 мг пертузумаба, а второй флакон содержит фиксированную дозу, составляющую примерно 525 мг пертузумаба.

VII Депозит материалов

Следующие линии клеток гибридомы депонированы в Американской коллекции типов культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Название антитела	№ATCC	Дата депозита
7C2	ATCC HB-12215	17 октября 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 октября 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 мая 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 апреля 1999

Дополнительные подробности изобретения иллюстрируются следующими не ограничивающими примерами. Сообщения о всех цитированных публикациях в

описании специально включены в данное описание в виде ссылки.

ПРИМЕР 1

В настоящем примере оценивали популяционные фармакокинетические (ФК) и прогностические ковариаты для HER-антитела пертузумаба и исследовали
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

СПОСОБЫ

Исследования и пациенты

Все три исследования, используемые в данном анализе, одобрены
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

Исследование 1 представляло собой открытое, проводимое в нескольких центрах исследование фазы Ia с использованием возрастающих доз для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетических профилей пертузумаба, вводимого
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

концентраций пертузумаба собирали в нескольких временных точках: перед введением дозы, в конце в/в-инфузии, в точках 1,5, 4 и 9 часов и на 2, 5, 8 и 15 день. Во время второго цикла лечения образцы сыворотки для определения концентраций пертузумаба собирали перед введением дозы, через 29 минут после начала в/в-инфузии и на 8 день.

Исследование 2 представляло собой открытое, неразветвленное, проводимое в нескольких центрах испытание фазы II для оценки общей эффективности, безопасности, переносимости и влияния вызванной опухолью активации HER2 на эффективность пертузумаба у пациентов с раком яичника на поздней стадии, у которых заболевание было рефрактерным или рецидивировало после предыдущей химиотерапии. Такие женщины получали в/в-инфузии пертузумаба, вводимого в виде единственно средства в течение 90-минутного периода во время 1-го цикла лечения в фиксированной дозе 840 мг, с последующей поддерживающей дозой 420 мг, доставляемой в виде 30-минутной инфузии один раз в 3 недели во время последующих циклов лечения. Во время первого и второго цикла лечения образцы сыворотки для определения концентраций пертузумаба собирали перед введением дозы, через 15 минут после окончания инфузии и на 8 и 15 день. Дополнительные образцы сыворотки для определения концентраций пертузумаба собирали перед введением дозы и через 15 минут после окончания в/в-инфузии во время последующих циклов лечения.

Исследование 3 представляло собой открытое, неразветвленное, проводимое в нескольких центрах рандомизированное исследование фазы II для оценки эффективности и безопасности двух разных доз пертузумаба, вводимого в виде единственного средства пациентам с метастатическим раком молочной железы с низкой экспрессией HER2. В группе получающих первую дозу пациенты получали пертузумаб в виде в/в-инфузии, вводимой в течение 90-минутного периода в виде ударной дозы 840 мг в 1-м цикле, с последующей поддерживающей дозой 420 мг, которую давали один раз в 3 недели в виде 30-минутной в/в-инфузии во время последующих циклов лечения. В группе получающих вторую дозу пациенты получали в/в-инфузию пертузумаба в виде дозы, составляющей 1050 мг, в течение 90-минутного периода в 1-м цикле и в виде дозы, составляющей 1050 мг, в виде 30-минутной в/в-инфузии каждые 3 недели во время последующих циклов лечения. В исследовании 3 образцы сыворотки для определения концентраций пертузумаба собирали перед введением дозы, через 15 минут после окончания инфузии и на 8 и 15 день во время первых двух циклов лечения. Дополнительные образцы сыворотки для определения концентраций пертузумаба собирали перед введением дозы и через 15 минут после окончания инфузии во время последующих циклов лечения.

Анализ лекарственного средства

Концентрации пертузумаба в сыворотке определяли, используя утвержденный твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) связывания рецептора. В анализе использовали внеклеточный домен p185HER2 для улавливания пертузумаба из образцов сыворотки. Связанный пертузумаб выявляли с помощью конъюгата мышинового антитела против Fc человека с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и использовали тетраметилбензидин (TMB) (KPL, Inc.) в качестве субстрата для развития окраски, чтобы количественно оценить пертузумаб в сыворотке. Минимальная количественно оцениваемая в анализе концентрация пертузумаба в сыворотке человека составляла 0,25 мкг/мл.

Популяционный фармакокинетический анализ

Популяционное нелинейное моделирование смешанного действия осуществляли,

используя компьютерную программу NONMEM™ (руководство для пользователей Boeckmann and Beal NONMEM™, San Francisco: NONMEM™ Project Group, University of California, San Francisco (1994)) (версия V, уровень 1.0) с NM-TRAN и PREDPP и компилятором Compaq Visual Fortran (версия 6.5). Две разные базовые структурированные модели, однокамерную и двухкамерную линейную ФК-модель с в/в-инфузией, подгоняли к временным данным о концентрации пертузумаба в сыворотке. В ходе всего процесса построения модели использовали способ оценки условий первого порядка (FOCE) с взаимным влиянием η - ϵ .

Экспоненциальную модель ошибок использовали для описания межиндивидуальной вариабельности ФК-параметров:

$$P_i = \hat{P}_i \exp(\eta_{ip}) \quad (1)$$

Мультипликативную регрессионную модель ковариат реализовали следующим образом:

$$\hat{P}_i = \theta_1 \left(\frac{X_i}{\text{med}(X)} \right)^{\theta_X} (1 + \theta_D D) \quad (2)$$

где η_{ip} означает пропорциональное различие между «истинными» параметрами (P_i) i -х отдельных пациентов и типичным значением ($\hat{P}_i$) в популяции,

скорректированным в соответствии со значениями ковариат, равных значениям для данного отдельного пациента. η_{ip} означает случайные эффекты с нулевым средним и дисперсией ω^2 . θ_X и θ_D являются коэффициентами регрессии, которые необходимо оценить для непрерывной (например, WT) или дихотомической (например, SEX и RACE) ковариат, соответственно. Непрерывные переменные центрировали у их медианных ($\text{med}(X)$) значений, таким образом, делая возможным, чтобы θ_1 означала оценку клиренса для типичного пациента с медианными ковариатами.

Дихотомические переменные кодировали 0 или 1 (например, SEX=0 для женщин, SEX=1 для мужчин; RACE=0 для европеоидов и RACE=1 для остальных). Остаточную вариабельность моделировали в виде модели пропорциональных аддитивных ошибок:

$C_{pij} = \hat{C}_{pij}(1 + \epsilon_{ij,prop}) + \epsilon_{ij,add}$, где C_{pij} и $\hat{C}_{pij}$ означают j -ю измеренную и предсказанную в модели концентрацию, соответственно, для i -го индивидуума, и $\epsilon_{ij,prop}$ и $\epsilon_{ij,add}$ означают пропорциональные и аддитивные остаточные межиндивидуальные случайные ошибки, распределенные с нулевыми значениями и дисперсиями σ_{prop}^2 и σ_{add}^2 .

Взаимосвязь между основанными на структурированной модели байесовыми оценками ФК-параметров и индивидуальными ковариатами исследовали графически.

На основании предварительных разведочных анализов тестировали влияние каждой ковариаты на ФК-параметры. Сначала исследовали влияние ковариат на отдельные ФК-параметры (т.е. клиренс и объем в центральной камере). Затем конструировали полную ковариатную модель для отдельных ФК-параметров, включая значимые ковариаты в модель. Использовали процесс обратного исключения для определения конечной ковариатной модели для каждого отдельного ФК-параметра, оставляя в модели только значимые ковариаты. В том случае, когда высокоррелированные ковариаты имели сходное фармакологическое значение (такие как масса и BSA), в модели сохраняли только наиболее значимый фактор. Затем такие полученные ковариатные модели для каждого ФК-параметра объединяли, образуя новую полную модель, и конечную популяционную ФК-модель усовершенствовали, используя процесс обратного исключения.

Сравнение альтернативных структурированных моделей и конструирование

ковариатной модели было основано на степени согласия типичных диагностических кривых и критерии максимального правдоподобия. При сравнении альтернативных иерархических моделей различия в значении целевой функции приблизительно распределены как хи-квадрат со степенью свободы n (n означает различие в количестве или параметрах между полной и уменьшенной моделью). Показано, что такая аппроксимация является надежной для способа оценки FOCE-INTERACTION (Wahlby et al. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 28:231-52 (2001)). Чтобы дискриминировать две иерархические модели, использовали различие целевой функции, составляющее более 7,9 (1 степень свободы), которое соответствует уровню значимости $p < 0,005$.

Долю межиндивидуальной варiances (% варiances), объясняемой ковариатами в регрессионной модели для данных ФК-параметров (например CL), рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ variance} = \left(\frac{\omega_{CL,BASED}^2 - \omega_{CL,FINAL}^2}{\omega_{CL,BASE}^2} \right) \times 100 \quad (3)$$

где $\omega_{CL,BASED}^2$ и $\omega_{CL,FINAL}^2$ означали межиндивидуальную варiances клиренса в базовой и конечной ФК-модели, соответственно.

Оценка популяционной фармакокинетической модели

При оценке модели в данном исследовании использовали метод повторной выборки с возвращением, чтобы оценить стабильность конечной модели и оценить доверительный интервал параметров. Такой способ оценки модели заключается сначала в создании наборов данных с использованием опции бутстреп в пакете компьютерных программ Wings для NONMEM™ (N Holford, версия 404, июнь 2003, Auckland, New Zealand), затем в получении оценок параметров для каждого повтора набора данных. Получали результаты на основании 1000 успешных прогонов и определяли среднее значение и 2,5-й и 97,5-й перцентили (указывающий 95% доверительный интервал) для популяционных параметров и сравнивали с оценками исходных данных.

Кроме того, использовали апостериорные прогностические проверки модели, чтобы оценить способность конечной модели описывать наблюдаемые данные (Yano et al., J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:171-92 (2001); Gelman и Meng, Model checking and model improvement. In: Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ, eds. Markov Chain Monte Carlo in Practice. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC, 189-202 (1996); Gelman et al. Bayesian Data Analysis. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC (2004)). В данном анализе рассчитывали 2,5-й, 5-й, 10-й, 25-й, 50-й (медиана), 75-й, 90-й и 95-й перцентили наблюдаемых данных и выбирали в качестве статистики критерия для апостериорной прогностической оценки модели. Конечную популяционную ФК-модель, включающую конечные постоянные параметры и параметры случайного эффекта, использовали для оценки 1000 повторов набора наблюдаемых данных и статистику критерия рассчитывали на основании каждого моделируемого набора данных. Апостериорное прогностическое распределение статистики критерия, основанной на моделируемом наборе данных, затем сравнивали с наблюдаемой статистикой критерия, и p -значение (p^{PPC}) можно оценить, рассчитывая долю случаев, в которых статистики критериев на основе моделируемого набора данных превышают реализуемое значение наблюдаемой статистики критерия, согласно следующему уравнению (Gelman and Meng, (1996) *выше*).

$$p^{PPC} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{1000} I(T(y_i^{rep}, \theta) \geq T(y, \theta_i)) \quad (1)$$

где $I(.)$ означает индикаторную функцию, которая принимает значение 1, когда ее аргумент является истинным, и 0 в противном случае. $T(y, \theta)$ означает «реализуемое значение» наблюдаемой статистики критерия, так как оно реализуется наблюдаемыми данными y . $T(y_i^{\text{rep}}, \theta)$ означает статистику критерия на основе моделируемого набора данных i (пределы от 1 до 1000) (Gelman and Meng, (1996) *выше*).

Кроме того, рассчитывали 2,5-й, 5-й, 95-й и 97,5-й квантиль моделируемых данных для каждой временной точки для отдельных пациентов. Определяли количества наблюдаемых данных, которые попадали в пределы 2,5-ого и 95,5-ого квантилей (95% интервал), 5-ого и 95-ого квантилей (90% интервал) объединенных моделируемых данных.

Воздействия пертузумабом после введения фиксированной, основанной на BSA- и основанной на массе дозы

Конечную популяционную ФК-модель использовали для определения устойчивых концентраций и воздействия после введения фиксированной, основанной на BSA- и основанной на массе дозы. Временные профили концентрации в сыворотке и клиренс пертузумаба для 1000 субъектов моделировали для схемы введения фиксированной, основанной на BSA или основанной на массе дозы, используя конечную модель с набором данных, полученных возвращением (с заменой) исходного набора ФК-данных. Все субъекты, используемые в модели, получали 840 мг, 12,2 мг/кг или 485 мг/м² посредством в/в-инфузии в течение 90 мин в 0 день, затем 420 мг, 6,1 мг/кг или 242,5 мг/м² в виде в/в-инфузии в течение 30 мин на 21, 42 и 63 день. Затем оценивали устойчивые концентрации, полученные на 84 день ($C_{ss, \text{trough}}$) после разных схем дозирования. Кроме того, рассчитывали процент субъектов с устойчивыми концентрациями ниже целевой концентрации (20 мкг/мл) после фиксированной, основанной на BSA или основанной на массе дозы. Моделируемые значения клиренса использовали для определения установившегося среднего воздействия ($AUC_{ss0-\tau}$) согласно следующему уравнению:

$$AUC_{ss0-\tau} = \frac{\text{Dose}}{CL} \quad (4)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические данные. Демографические характеристики пациентов, включенных в данный ФК-анализ, перечислены в таблице 2.

Таблица 2 Демографические характеристики пациентов, включенных в анализ		
	Медиана	Пределы
Возраст (годы)	56,0	32,0-78,0
BSA* (м ²)	1,73	1,40-2,53
Масса (кг)	69,0	45,0-150,6
Альбумин (г/л)	39,2	21,0-52,0
Щелочная фосфатаза (ALK) (ед./л)	107,0	39,0-367,0
	Количество пациентов	%
Пол		
Мужской	8	5,2
Женский	145	94,8
Раса		
Европеиды	141	92,2
Афроамериканцы	3	2,0
Испанцы	4	2,6
Азиаты	3	2,0

Коренные индейцы	0	0
Другие	2	1,3
* BSA, площадь поверхности тела		

5 Всего собирали 1458 временных точек концентрации пертузумаба от 153 пациентов в трех исследованиях. Из них 18 пациентов были в испытании фазы Ia, 60 - в испытании фазы II с раком яичника, и 75 - в испытании фазы II с раком молочной железы. Таким образом, большинство (94,8%) пациентов в данном анализе были женского пола и на них получали 1110 (76%) данных о концентрации пертузумаба в сыворотке. Все субъекты имели опухоль с низкой экспрессией HER2, 10 подтвержденную FISH-анализом (флуоресцентной гибридизацией *in situ*), и имели хорошее физическое функциональное состояние, которое оценено баллами состояния работоспособности ECOG (Восточная объединенная онкологическая группа) либо 0, 15 либо 1. Количество пациентов с отсутствующими ковариатами было очень небольшим (4,6% и для роста, и для BSA), и отсутствующие ковариаты вносили с медианными значениями. В случае 384 (20,8%) образцов концентрации пертузумаба в сыворотке, для которых зарегистрирована только дата отбора образца, в качестве времени отбора образца вносили 12 часов дня. Анализ чувствительности, проводимый 20 для оценки влияния указанного введенного времени на оценки популяционных параметров в модели, не выявил значимого влияния.

Популяционный ФК-анализ

Двухкамерная модель описывала данные лучше, чем однокамерная модель, 25 основанная на изменении целевой функции ($\delta = -736,2$) и диагностических графиках. Типичная подгонка временного профиля концентрации пертузумаба в сыворотке к однокамерной и двухкамерной модели показана на фиг.9А-В. Член межиндивидуальной вариабельности (η) K12 удаляли из двухкамерных моделей, так как удаление такого члена η не приводит к статистически значимому увеличению 30 ($\delta < 7,88$) целевой функции. Следовательно, в конечной базовой модели оставляли только η_{CL} , η_{Vc} и η_{K21} .

Затем оценивали влияние наличия ковариации между η_{CL} , η_{Vc} и η_{K21} . Включение 35 условий ковариации между η_{CL} , η_{Vc} и η_{K21} улучшало подгонку ($\delta = -23,2$, $df=3$). Однако было обнаружено, что условия ковариации плохо определяются ($\%CV > 100$), имеют низко оцениваемую корреляцию ($r_{CL-Vc}=0,37$; $r_{CL-K21}=0,27$; $r_{Vc-K21}=0,42$) и мало влияют на оценки параметров (данные не показаны). Поэтому условия ковариации не сохраняли для построения модели влияния ковариат. В разведочном анализе с использованием конечной базовой модели не идентифицировали очевидных 40 взаимосвязей между потенциальными ковариатами и η_{K21} . Поэтому влияние ковариат на η_{K21} не исследовали во время разработки конечной модели с ковариатами.

Для конечной модели с ковариатами графики рассчитанных концентраций пертузумаба в сыворотке в зависимости от наблюдаемых концентраций пертузумаба в сыворотке и взвешенных невязок в зависимости от рассчитанной концентрации в сыворотке показаны на фиг.10А-В. В конечной модели сывороточный 45 альбумин (ALB), масса тела (BW) и щелочная фосфатаза в сыворотке (ALKP) были наиболее значимыми ковариатами, объясняющими межиндивидуальную вариабельность в отношении клиренса пертузумаба (CL). BSA представляла собой наиболее значимую ковариату, объясняющую межиндивидуальную вариабельность 50 объема распределения пертузумаба в центральной камере (Vc). Включение условия ковариации между η_{CL} , η_{Vc} и η_{K21} улучшало подгонку ($\delta = -14,0$, $df=3$). Однако оцениваемая корреляция была невысокой ($r_{CL-Vc}=0,45$; $r_{CL-K21}=0,28$; $r_{Vc-K21}=0,39$) и не

было влияния на оценки параметров (данные не показаны). Поэтому условия ковариации не включали в конечную модель. Конечную модель иллюстрировали следующим образом:

$$CL = \theta_{CL} \times \left(\frac{WT}{69}\right)^{\theta_{WT_CL}} \times \left(\frac{ALB}{39.2}\right)^{\theta_{ALB_CL}} \times \left(\frac{ALKP}{107}\right)^{\theta_{ALKP_CL}} \quad (4)$$

$$Vc = \theta_{Vc} \times \left(\frac{BSA}{1.72}\right)^{\theta_{BSA_Vc}} \quad (5)$$

Оценки параметров конечной модели суммированы в таблице 3.

10

Таблица 3 Оценки параметров конечной популяционной фармакокинетической модели и стабильность параметров с использованием способа проверки бутстреп		
	Исходный набор данных	1000 бутстреп-повторов
	Оценка (%RSE) ^a	Среднее (95% CI)
Структурная модель		
CL (л/сутки)	0,214 (3,1)	0,214 (0,201, 0,228)
V _c (л)	2,740 (1,9)	2,739 (2,640, 2,840)
K ₁₂ (день ⁻¹)	0,203 (16,6)	0,229 (0,159, 0,416)
K ₂₁ (день ⁻¹)	0,258 (15,6)	0,275 (0,203, 0,480)
Межиндивидуальная вариабельность		
CL %CV	31,1 (11,0)	30,6 (27,0 34,1)
V _c %CV	16,2 (20,3)	16,0 (12,7, 19,2)
K ₂₁ %CV	25,2 (37,6)	24,1 (11,4, 33,6)
Ковариатная модель		
ALB на CL (θ _{ALB_CL})	-1,010 (18,4)	-1,019 (-1,420, -0,632)
WT на CL (θ _{WT_CL})	0,587 (19,3)	0,589 (0,372, 0,826)
ALKP на CL (θ _{ALKP_Vc})	0,169 (29,5)	0,170 (0,067, 0,258)
BSA на Vc (θ _{BSA_Vc})	1,160 (12,2)	1,151 (0,890, 1,451)
Остаточная вариабельность		
Пропорциональная ошибка, σ ² _{проп}	0,037 (19,4)	0,037 (0,030, 0,045)
Аддитивная ошибка, σ _{проп} , мкг/мл	0,265 (77,8)	2,24 (0,002, 4,160)
a. %RSE: относительная стандартная ошибка оценки в процентах=SE/оценка параметра×100		

Оценивали CL пертузумаба в сыворотке в анализе популяции, составляющий 0,214 л/сутки, и Vc 2,74 л. K₁₂ и K₂₁ составляли 0,203 и 0,258 дней⁻¹, соответственно. Межиндивидуальная вариабельность CL и Vc в конечной модели, рассчитанная в виде квадратного корня межиндивидуальной дисперсии (ω²) и выраженная в виде %CV, составляла 31,1% и 16,2%, соответственно, по сравнению с 38,0% и 20,8% для базовой модели без ковариат. Поэтому влиянием ковариат ALB, WT и ALKP в конечной модели объяснялось примерно 33% межиндивидуальной дисперсии для CL. Однако масса отдельно объясняла только 8,3% вариабельности CL между пациентами. Влияние ковариаты BSA объясняло примерно 39% межиндивидуальной дисперсии для Vc в конечной модели. Зависимость CL от WT и Vc от BSA в базовой модели учитывали в конечной модели, как показано на фиг.11А-В. Оцениваемые t_{1/2α} и t_{1/2β} составляли 1,4 и 17,2 суток, соответственно.

Оценка модели

На основании исходного набора данных получали 1000 успешных прогонов с помощью методики бутстреп и сравнивали с исходными наблюдаемыми данными. Средние популяционные ФК-оценки, полученные в процессе бутстреп, были сходны с оценками параметров исходного набора данных (таблица 3), свидетельствуя, что разработанная модель была стабильной. 95% Доверительные интервалы для

параметров постоянного действия были близкими, что свидетельствует о хорошей точности.

Апостериорную прогностическую проверку модели использовали для оценки способности конечной модели описывать наблюдаемые данные. Конечную популяционную фармакокинетическую модель, включающую конечные постоянные параметры и параметры случайного эффекта, использовали для моделирования 1000 повторов. Затем рассчитывали статистику критерия для каждого из указанных 1000 моделируемых наборов данных. На фиг.12A-F показаны гистограммы 1000 моделируемых значений выбранной статистики критерия, при этом «реализуемое значение» наблюдаемой статистики критерия показано вертикальной линией. Апостериорные прогностические распределения были близки наблюдаемым значениям с оцениваемыми р-значениями выше 0,05 для каждой статистики критерия. Кроме того, проценты наблюдаемых концентраций пертузумаба в пределах от 90% до 95% квантиля объединенных моделируемых данных составляли 89,3 и 94,7%, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что модель способна достаточно хорошо описывать и предсказывать данные.

Воздействия пертузумаба после введения фиксированной, основанной на BSA и основанной на массе дозы

Прогнозируемые устойчивые концентрации пертузумаба в сыворотке на 84 день ($C_{ss, trough}$) оценивали для 1000 моделируемых субъектов, данные о которых вводили бутстреп-методом из набора исходных ФК-данных согласно конечной модели с использованием фиксированной, основанной на массе или основанной на BSA дозы по схемам дозирования, указанным в разделе «Способы». Полученные данные показали, что при основном на массе и основном на BSA дозировании популяционная вариабельность $C_{ss, trough}$ снижалась на 6,17 и 5,76%, соответственно, по сравнению с введением фиксированной дозы (фиг.13 и таблица 4).

Таблица 4

Прогнозируемая устойчивая концентрация пертузумаба (84 день) после фиксированной, основанной на массе или основанной на BSA дозы для 1000 моделируемых субъектов, данные о которых вводили бутстреп-методом из исходного набора ФК-данных согласно конечной модели

	Css trough (мкг/мл) фиксированная доза	Css trough (мкг/мл) основанная на массе доза	Css trough (мкг/мл) основанная на BSA доза
Минимум	2,68	2,39	2,54
5-й перцентиль	16,56	16,32	16,86
Медиана	51,87	51,81	52,48
Среднее	56,37	56,08	56,44
95-й перцентиль	115,38	110,46	112,14
Максимум	209,67	179,06	192,00
%CV	54,05	52,62	52,40
Варианса	928,21	870,93	874,71
% изменения вариации по сравнению с фиксированной дозой ^a	-	-6,17	-5,76
Процент субъектов с $C_{ss, trough} \leq 20$ мкг/мл	8,3	8,7	8,3

^a изменение вариации в процентах по сравнению с фиксированной дозой рассчитывали, используя следующее уравнение:

$$\text{Изменение вариации в процентах} = \frac{\text{Варианса}_{\text{основанная на WT или BSA доза}} - \text{Варианса}_{\text{фиксированная доза}}}{\text{Варианса}_{\text{фиксированная доза}}} \times 100$$

Проценты субъектов с $C_{ss, trough}$ ниже целевой концентрации в сыворотке 20 мкг/мл были сходными со значениями 8,3%, 8,7% и 8,3% для введения фиксированной, основанной на массе или основанной на BSA дозы, соответственно (таблица 4).

Сходные результаты получали при анализе установившегося $AUC_{ss0-\tau}$ пертузумаба в сыворотке для 1000 моделируемых субъектов, и основанное на массе и основанное на BSA дозирование снижало популяционную вариабельность только на 2,2 и 4,2%, соответственно, по сравнению с фиксированной дозой. Такой же моделируемый набор данных использовали для определения $C_{ss, trough}$ после фиксированной дозы, основанной на массе и основанной на BSA дозы для популяций с экстремальным значением массы (т.е. $WT \leq 10$ -му и ≥ 90 -му перцентилю) (фиг.14А-В). Медианные значения $C_{ss, trough}$ пертузумаба для популяции с WT меньше или равной 10-му перцентилю составляли 72,3 (пределы: от 8,7 до 166,5), 52,8 (пределы: от 6,8 до 125,7) и 63,2 (пределы: от 7,8 до 150,1) мкг/мл для фиксированной дозы, основанной на массе и основанной на BSA дозы, соответственно. Проценты субъектов в популяции с $C_{ss, trough}$ ниже целевой концентрации в сыворотке 20 мкг/мл составляли 5,4%, 12,6% и 9,0% для фиксированной, основанной на массе и основанной на BSA дозы, соответственно. Медианные значения $C_{ss, trough}$ пертузумаба для популяции с WT больше или равной 90-му перцентилю составляли 42,1 (пределы: от 7,0 до 119,8), 62,8 (пределы: от 14,4 до 167,3) и 52,9 (пределы: от 10,2 до 133,3) мкг/мл для фиксированной дозы, основанной на массе и основанной на BSA дозы, соответственно. Проценты субъектов в данной популяции с $C_{ss, trough}$ ниже целевой концентрации в сыворотке 20 мкг/мл были сходными, со значениями 7,4%, 2,8% и 5,6% для фиксированной, основанной на массе или основанной на BSA дозы, соответственно. Сходные результаты получали при анализе установившегося $AUC_{ss0-\tau}$ пертузумаба в сыворотке для таких подгрупп среди 1000 отдельных субъектов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно гуманизированные моноклональные IgG-антитела и цитотоксические низкомолекулярные лекарственные средства в онкологии вводили в виде основанных на массе (мг/кг) или основанных на BSA доз. Пертузумаб подвергали тестированию в клиническом испытании фазы Ia у пациентов со злокачественными опухолями на поздней стадии и в испытаниях фазы II у пациентов с раком яичника, молочной железы, легкого и простаты. Пертузумаб дозировали на основании массы (мг/кг) в испытании фазы I и затем начинали применение фиксированной дозы в испытаниях фазы II. Используя демографические данные и временные данные о концентрации пертузумаба в сыворотке, собранные в указанных трех испытаниях, построили популяционную ФК-модель с прогностическими ковариатами для ФК пертузумаба. Затем полученную модель использовали для исследования устойчивых концентраций после применения введения фиксированной дозы и способов дозирования на основе массы и BSA.

ФК пертузумаба, полученная на основе такого анализа, была очень сходной с ФК, полученной для других гуманизированных моноклональных IgG1-средств, используемых в онкологии (Harris et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 21:488a (2002); Leyland-Jones et al., J. Clin. Oncol. 21:3965-71 (2003); и Lu et al. Clin. Pharmacol. Ther. 75:91 (2004)).

Линейная 2-камерная ФК-модель лучше всего описывает данные, и в конечной модели CL пертузумаба составлял 0,214 л/сутки. Типичный V_c пертузумаба составлял 2,74 л или примерно 40 мг/кг, что равно объему плазмы человека, и был совместим со значениями, сообщаемыми для других моноклональных IgG1-средств (Harris et al. (2002), *выше*, и Lu et al. (2004), *выше*). На CL пертузумаба значимо влияла масса тела и концентрации в сыворотке альбумина и щелочной фосфатазы, тогда как BSA не оказывала значимого влияния на V_c . Влияние пола на ФК

пертузумаба нельзя оценить из-за небольшого количества субъектов мужского пола (5,2%), включенных в анализ. Результаты бутстреп-способа и апостериорной проверки модели свидетельствуют, что конечная модель была стабильной и способной достаточно хорошо описывать и прогнозировать данные.

Влияние массы на CL и BSA на V_c свидетельствует, что пертузумаб можно дозировать либо на основе массы тела, либо на основе BSA. Однако влияние ковариат массы отдельно и BSA отдельно в модели объясняло только примерно 8,3% и 40% межиндивидуального влияния на CL и V_c , соответственно. Это свидетельствует о том, что хотя масса является прогностическим параметром для CL и BSA является прогностическим параметром для V_c , влияние массы и BSA на воздействия пертузумаба после введения дозы может быть измеряемым, но не вносящим большого вклада.

Поэтому на следующей стадии оценивали влияние различных способов дозирования на воздействия пертузумаба, используя моделирование. Обнаружили, что у 1000 субъектов, данные о которых вводили бутстреп-методом из исходного набора данных, основанное на массе или основанное на BSA дозирование снижало популяционную вариабельность моделируемых устойчивых концентраций в сыворотке на 84 день только на 6,2 и 5,8%, соответственно, по сравнению с введением фиксированной дозы. Кроме того, проценты субъектов с рассчитанными устойчивыми концентрациями в сыворотке ниже выбранного целевого значения 20 мкг/мл были сходными при всех трех способах дозирования. Сходные результаты получали в результате анализа подгрупп в популяции с экстремальными значениями массы тела (т.е. $WT \leq 10$ -му и ≥ 90 -му перцентилу).

Поэтому сделан вывод, что ФК пертузумаба связана с WT и BSA. Однако WT и BSA объясняли только небольшой процент межиндивидуальной вариабельности CL и V_c , и основанное на WT и BSA дозирование, по-видимому, не улучшает предсказуемость воздействий пертузумаба в стационарном состоянии. Рекомендуется применять схемы введения фиксированных доз пертузумаба для онкологических пациентов.

Полагают, что настоящее изобретение представляет собой первое раскрытие критической оценки влияния основанного на массе или на BSA дозирования гуманизированного моноклонального IgG1-антитела на устойчивые концентрации лекарственного средства у онкологических пациентов. Осуществление единообразного фиксированного дозирования имеет несколько значимых для лечения пациентов и экономических последствий: i) более низкие затраты за счет более высокой эффективности при производстве, хранении и поставке стандартной лекарственной дозы, ii) эффективное приготовление стандартной дозы в аптеках и стационарах без необходимости индивидуализации пациентов, iii) более высокая оперативность в назначении врачом стандартной лекарственной дозы и iv) более низкая вероятность, что пациент получит неправильную дозу из-за ошибок в расчете дозы. Хотя гуманизированные антитела обычно дозируют по массе или BSA, проведенные согласно изобретению анализы показывают применимость введения HER-антитела пертузумаба с использованием фиксированной дозы онкологическим пациентам.

Формула изобретения

1. Способ лечения злокачественной опухоли у больного человека, включающий введение пациенту по меньшей мере одной фиксированной дозы пертузумаба, при

этом фиксированная доза выбрана из группы, состоящей из примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг и примерно 1050 мг пертузумаба.

2. Способ по п.1, в котором фиксированную дозу пертузумаба вводят пациенту примерно один раз в 3 недели.

3. Способ по п.1 или 2, в котором злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака яичника, рака брюшины, рака фаллопиевых труб, метастатического рака молочной железы (МВС), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака простаты и рака прямой и ободочной кишки.

4. Изделие производства, включающее флакон, содержащий фиксированную дозу пертузумаба, при этом фиксированная доза выбрана из группы, состоящей из примерно 420 мг, примерно 525 мг, примерно 840 мг и примерно 1050 мг пертузумаба.

5. Изделие производства по п.4, дополнительно содержащее вкладыш в упаковку с инструкциями для пользователя по введению фиксированной дозы пациенту со злокачественной опухолью.

6. Изделие производства по п.5, в котором злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака яичника, рака брюшины, рака фаллопиевых труб, метастатического рака молочной железы (МВС), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака простаты и рака прямой и ободочной кишки.

7. Изделие производства по п.5, в котором вкладыш в упаковку содержит дополнительные инструкции для пользователя по введению фиксированной дозы пациенту со злокачественной опухолью, у которого в злокачественной опухоли наблюдается экспрессия, амплификация или активация HER.

8. Изделие производства по п.5, включающее два флакона, при этом первый флакон содержит фиксированную дозу пертузумаба, составляющую примерно 840 мг, а второй флакон содержит фиксированную дозу пертузумаба, составляющую примерно 420 мг.

9. Изделие производства по п.5, включающее два флакона, при этом первый флакон содержит фиксированную дозу пертузумаба, составляющую примерно 1050 мг, а второй флакон содержит фиксированную дозу пертузумаба, составляющую примерно 525 мг.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ALLISON, DAVID E.
BRUNO, RENE
LU, JIAN-FENG
NG, CHEE M.

<120> ВВЕДЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ДОЗ HER-АНТИТЕЛ

<130> P2202R1

<141> 2005-06-15

<150> US 60/645,697

<151> 2005-01-21

<160> 22

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp	Thr	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
				50					55					60
Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15
Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75

Ser	Arg	Ile	Val	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Glu	Asp
						80				85				90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
						95				100				105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	
						110				115				

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> последовательность синтезирована

<400> 3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> последовательность синтезирована

<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
				95					100					105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				110					115					

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> последовательность синтезирована

<400> 5

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
				20					25					30
Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> последовательность синтезирована

<400> 6

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20					25					30
Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr
				50					55					60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu
				95					100					105

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована.

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> Xaa предпочтительно является D или S

<400> 7
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована.

<400> 8
Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована.

<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована.

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность синтезирована

<220>

<221> Хаа

<222> 5

<223> Хаа предпочтительно является R или L

<220>

<221> Хаа

<222> 6

<223> Хаа предпочтительно является Y или E

<220>

<221> Хаа

<222> 7

<223> Хаа предпочтительно является T или S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Хаа Хаа Хаа
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована.

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована.

<400> 13

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120

Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована.

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
				95					100					105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
				110					115					120
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
				125					130					135
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
				140					145					150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
				155					160					165
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				170					175					180
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				185					190					195
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				200					205					210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				215					220					225

His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly	Pro
230		235	240
Ser Val Phe Leu	Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met	Ile
245		250	255
Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser	His
260		265	270
Glu Asp Pro Glu	Val Lys Phe Asn Trp	Tyr Val Asp Gly Val	Glu
275		280	285
Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser
290		295	300
Thr Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp	Trp
305		310	315
Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys Ala	Leu
320		325	330
Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln	Pro
335		340	345
Arg Glu Pro Gln	Val Tyr Thr Leu Pro	Pro Ser Arg Glu Glu	Met
350		355	360
Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe	Tyr
365		370	375
Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly Gln Pro	Glu
380		385	390
Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly	Ser
395		400	405
Phe Phe Leu Tyr	Ser Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg Trp	Gln
410		415	420
Gln Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val	Met His Glu Ala Leu	His
425		430	435
Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly	
440		445	

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована.

<400> 15

Asp Ile Gln Met	Thr Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ser Ala Ser	Val
1	5	10	15
Gly Asp Arg Val	Thr Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Asp Val	Asn
20		25	30
Thr Ala Val Ala	Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Lys Ala Pro	Lys
35		40	45
Leu Leu Ile Tyr	Ser Ala Ser Phe Leu	Tyr Ser Gly Val Pro	Ser
50		55	60
Arg Phe Ser Gly	Ser Arg Ser Gly Thr	Asp Phe Thr Leu Thr	Ile
65		70	75
Ser Ser Leu Gln	Pro Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys Gln	Gln
80		85	90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность синтезирована

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 95 100 105
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180

Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
				185						190					195
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
				200						205					210
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
				215						220					225
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
				230						235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245						250					255
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				260						265					270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
				275						280					285
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
				290						295					300
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				305						310					315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
				320						325					330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				335						340					345
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
				350						355					360
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
				365						370					375
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				380						385					390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				395						400					405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				410						415					420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				425						430					435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				440						445					

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована.

<400> 17

Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
1				5					10					15	
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	
				20					25					30	
Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	
				35					40					45	

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	
				50					55					60	
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
				65					70					75	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
				80					85					90	
Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
				95					100					105	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	
				110					115					120	
Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	
				125					130					135	
Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	
				140					145					150	
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	
				155					160					165	
Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
				170					175					180	
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
				185					190					195	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
				200					205					210	
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
				215											

<210> 18

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 18

Clu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	
				20					25					30	
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	
				95					100					105	
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
				110					115					120	
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
				125					130					135	

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
				140					145					150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
				155					160					165
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				170					175					180
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				185					190					195
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				200					205					210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				215					220					225
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				260					265					270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275					280					285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
				290					295					300
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				305					310					315
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
				320					325					330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				335					340					345
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
				350					355					360
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				365					370					375
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
				380					385					390
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				395					400					405
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				410					415					420
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				425					430					435
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
				440					445					

<210> 19

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala
1					5				10					15

```

Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
      20                      25                      30
Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
      35                      40                      45
Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
      50                      55                      60
Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
      65                      70                      75
Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
      80                      85                      90
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
      95                      100                     105
Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
     110                      115                     120
Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
     125                      130                     135
Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
     140                      145                     150
Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
     155                      160                     165
Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
     170                      175                     180
Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
     185                      190                     195

```

```

<210> 20
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 20
Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
  1                      5                      10                      15
Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
     20                      25                      30
Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
     35                      40                      45
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp
     50                      55                      60
Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
     65                      70                      75
Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
     80                      85                      90
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
     95                      100                     105
Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
    110                      115                     120
Cys Ala Arg Val

```

```

<210> 21
<211> 169
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 21

Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Val
1				5					10					15
Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	Ile	Phe
			20						25					30
Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	Ala
			35						40					45
Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	Glu
			50						55					60
Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
			65						70					75
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile
			80						85					90
Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln
			95						100					105
Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu
			110						115					120
Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe
			125						130					135
Val	His	Thr	Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln
			140						145					150
Ala	Leu	Leu	His	Thr	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly
			155						160					165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22

<211> 142

<212> PRT

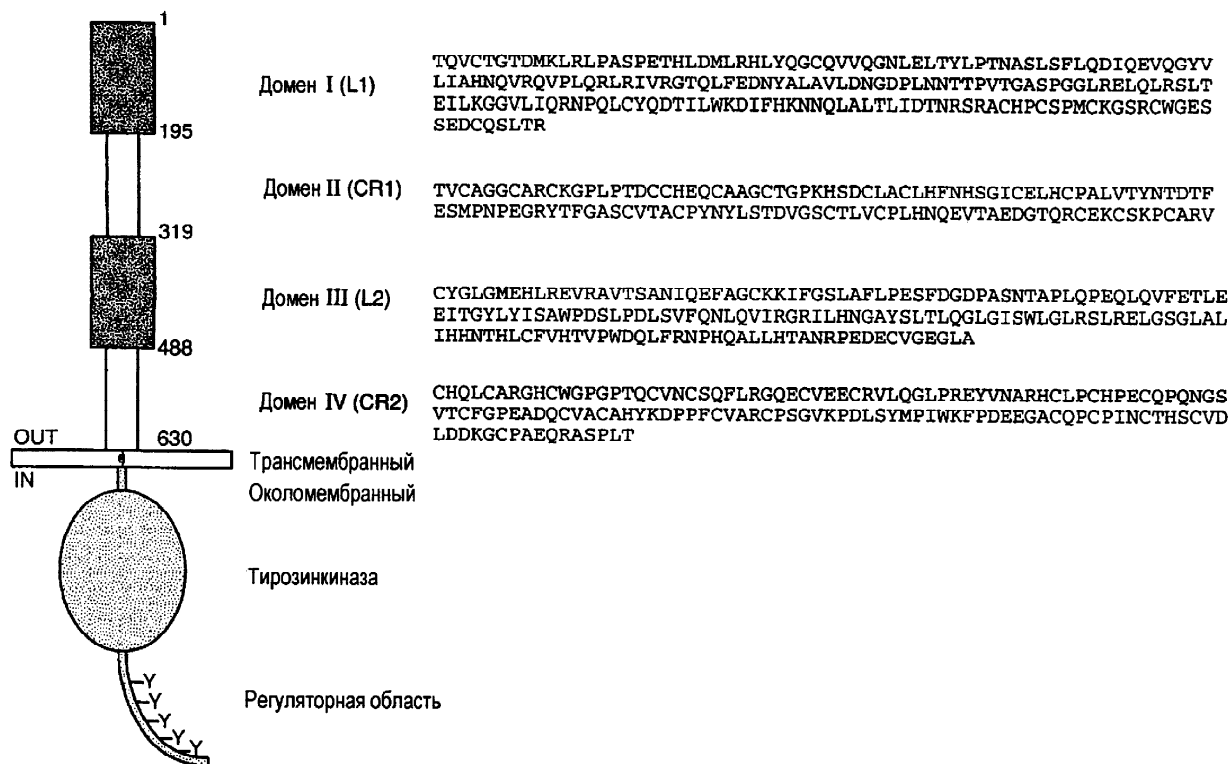
<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro
1				5					10					15
Thr	Gln	Cys	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys
			20						25					30
Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val
			35						40					45
Asn	Ala	Arg	His	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln
			50						55					60
Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val
			65						70					75
Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys
			80						85					90
Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys
			95						100					105
Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys
			110						115					120
Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu
			125						130					135

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr

140



ФИГ. 1

ВАРИАБЕЛЬНЫЙ ДОМЕН ЛЕГКОЙ ЦЕПИ

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQRP	
	**	**** *	*	*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQKP	
		*	** **	
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQIS NYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**	* *	*	**
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)		
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)		
	*** *			
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)		

ФИГ. 2А

ВАРИАБЕЛЬНЫЙ ДОМЕН ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	*** ** *	*** *		**
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		*** **		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50	a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **		*** * **** *		
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** ** *		* * *		
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:2)
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:4)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:6)

ФИГ. 2В

Аминокислотная последовательность легкой цепи пертузумаба

1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQDVSIGVA	WYQOKPGKAPKLLIYS	ASRYRTGVPS			
70	80	90	100	110	120	
RFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYYIYPYT	FTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP			
130	140	150	160	170	180	
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYP	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	STYLSSTLT				
190	200	210				
LSKADYEKHKVYACEVTHQGL	SSPVTKSFNRGEC					

ФИГ. 3А

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи пертузумаба

```

1      10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFTTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY

70      80      90      100     110     120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA

130     140     150     160     170     180
STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

190     200     210     220     230     240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

250     260     270     280     290     300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
*

310     320     330     340     350     360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSREEM

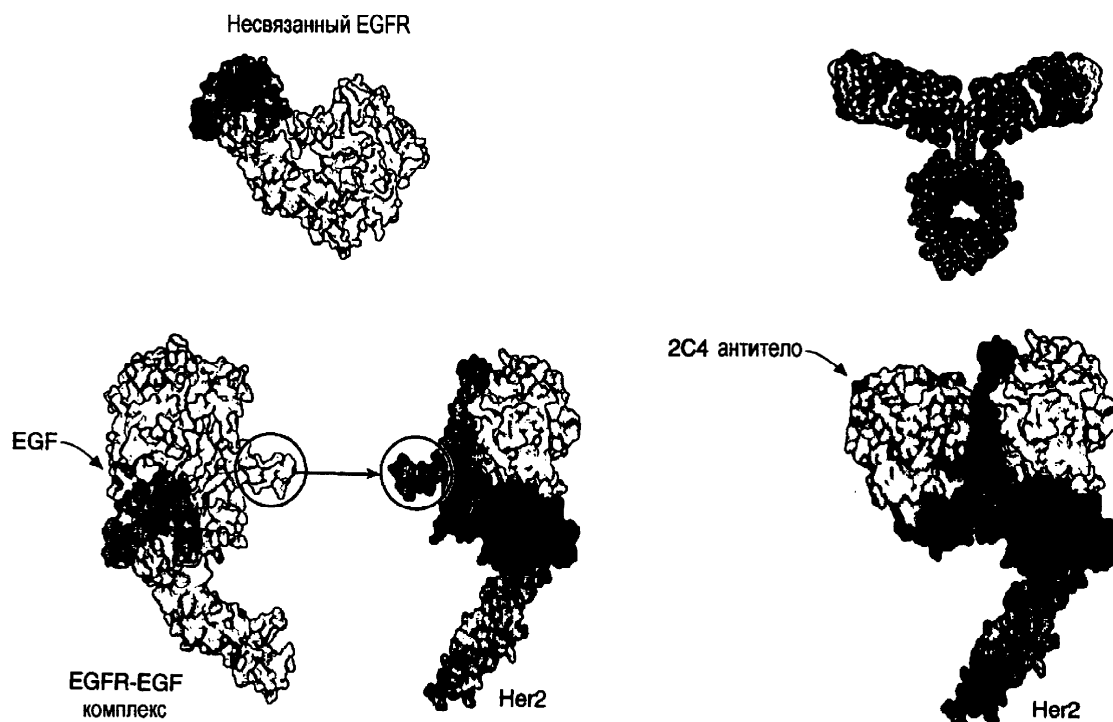
370     380     390     400     410     420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

430     440     448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

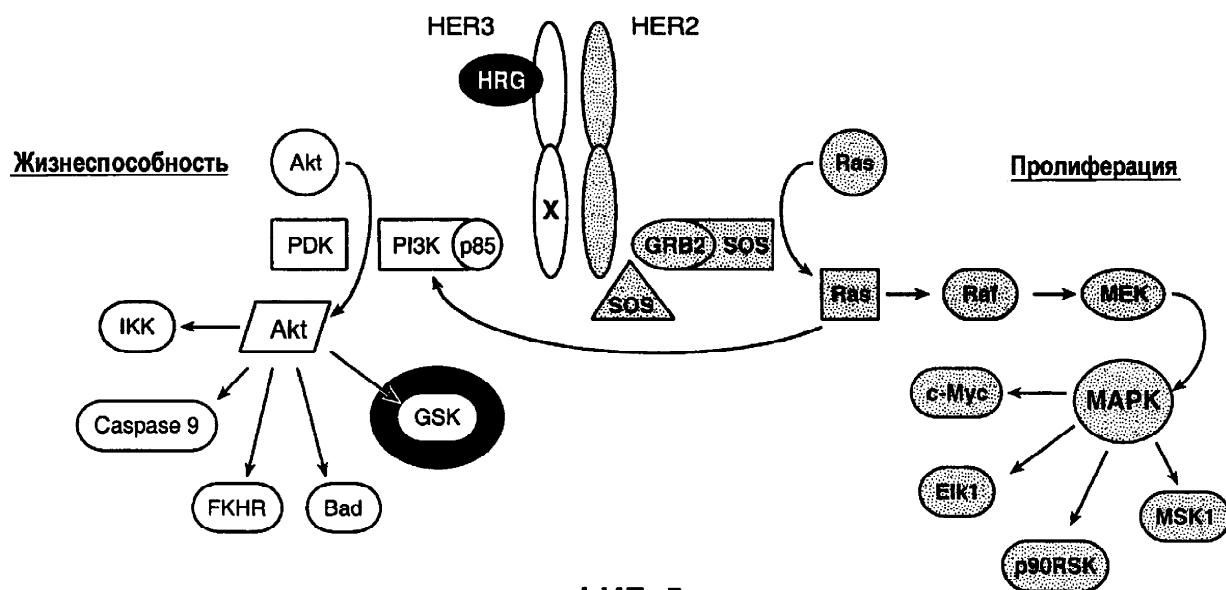
ФИГ. 3В

Активируемая лигандом гетеродимеризация EGFR с HER2, 2C4 связывается с сайтом связывания в гетеродимере



ФИГ. 4

Сопряжение HER2/3 с путями MAPK и Akt



ФИГ. 5

Трастузумаб
Герцептин



Пертузумаб
Омнитарг



- Связывается в IV вблизи JM.
- Защищает от "сбрасывания" рецептора
- Умеренно влияет на подавление рецептора
- Слабо влияет на роль HER2 в качестве корецептора

- Связывается с II на поверхности контакта при димеризации
- Не предотвращает "сбрасывание" рецептора
- Умеренно влияет на подавление рецептора
- Большое влияние на роль HER2 в качестве корецептора

ФИГ. 6

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ

1 15 30 45
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K
 46 60 75 90
 L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 91 105 120 135
 H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 136 150 165 180
 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 181 195 210 214
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

ФИГ. 7А

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ

1 15 30 45
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L
 46 60 75 90
 E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D
 91 105 120 135
 T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S
 136 150 165 180
 K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 181 195 210 225
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
 226 240 255 270
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
 271 285 300 315
 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
 316 330 345 360
 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
 361 375 390 405
 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
 406 420 435 449
 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

ФИГ. 7В

1 15 30 45
 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K
 46 60 75 90
 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
 91 105 120 135
 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
 136 150 165 180
 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
 181 195 210 217
 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

ФИГ. 8А

```

1      15      30      45
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L

46     60     75     90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D

91    105    120    135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K

136   150   165   180
S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G

181   195   210   225
L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T

226   240   255   270
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H

271   285   300   315
E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W

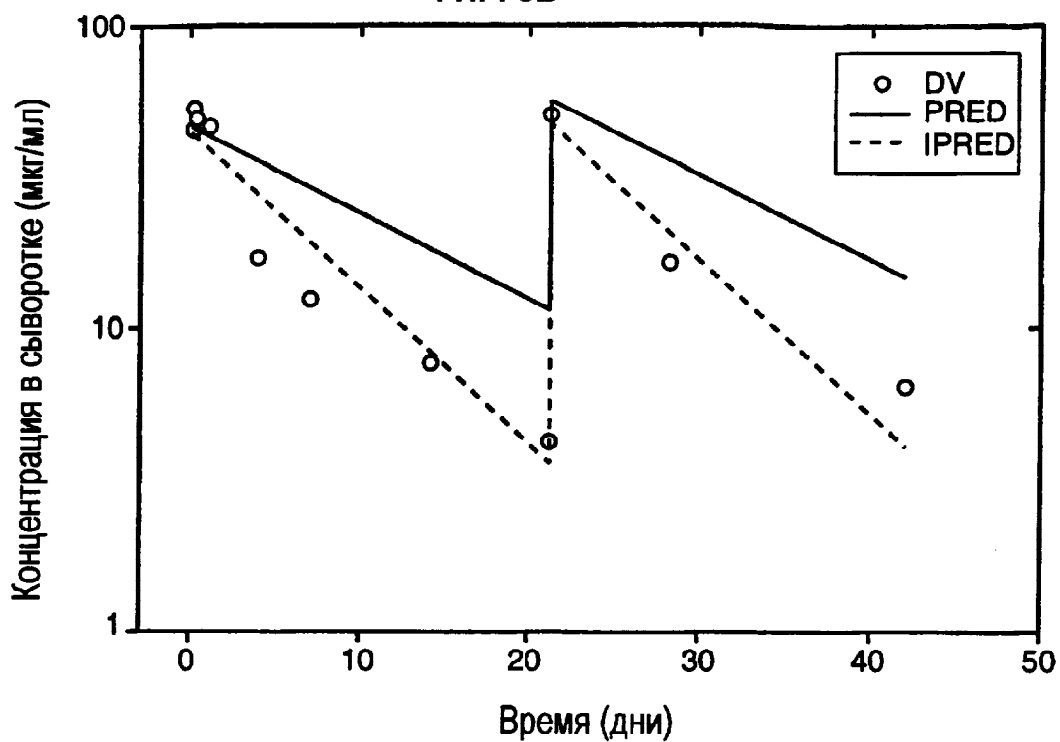
316   330   345   360
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M

361   375   390   405
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S

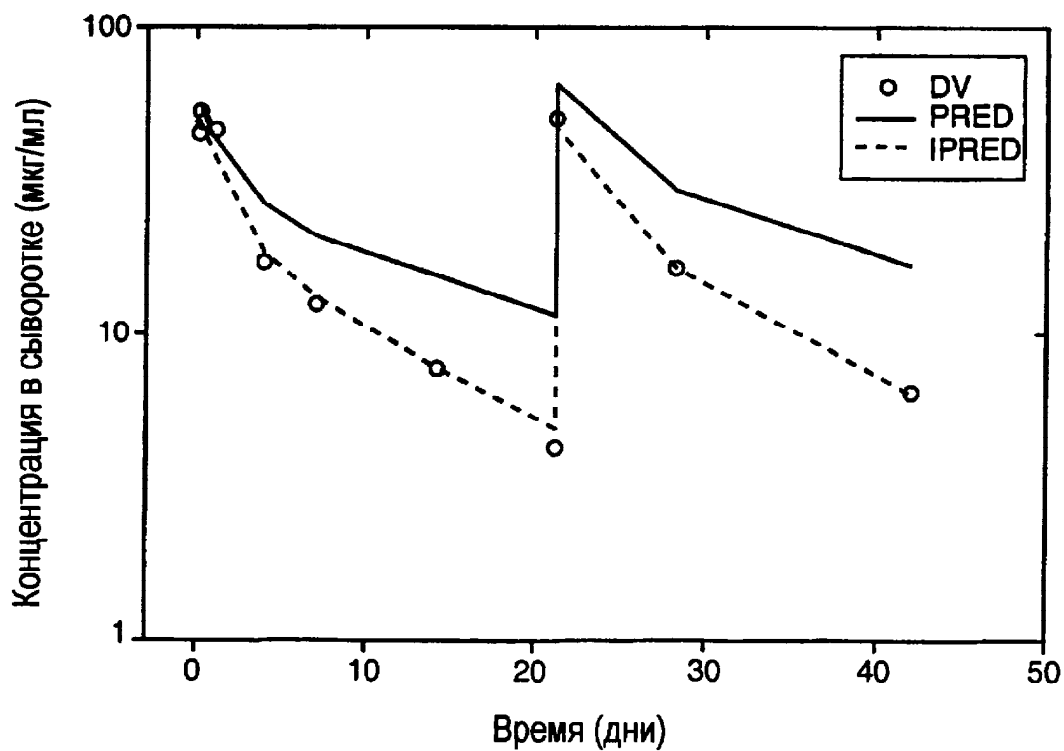
406   420   435   449
F P L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

```

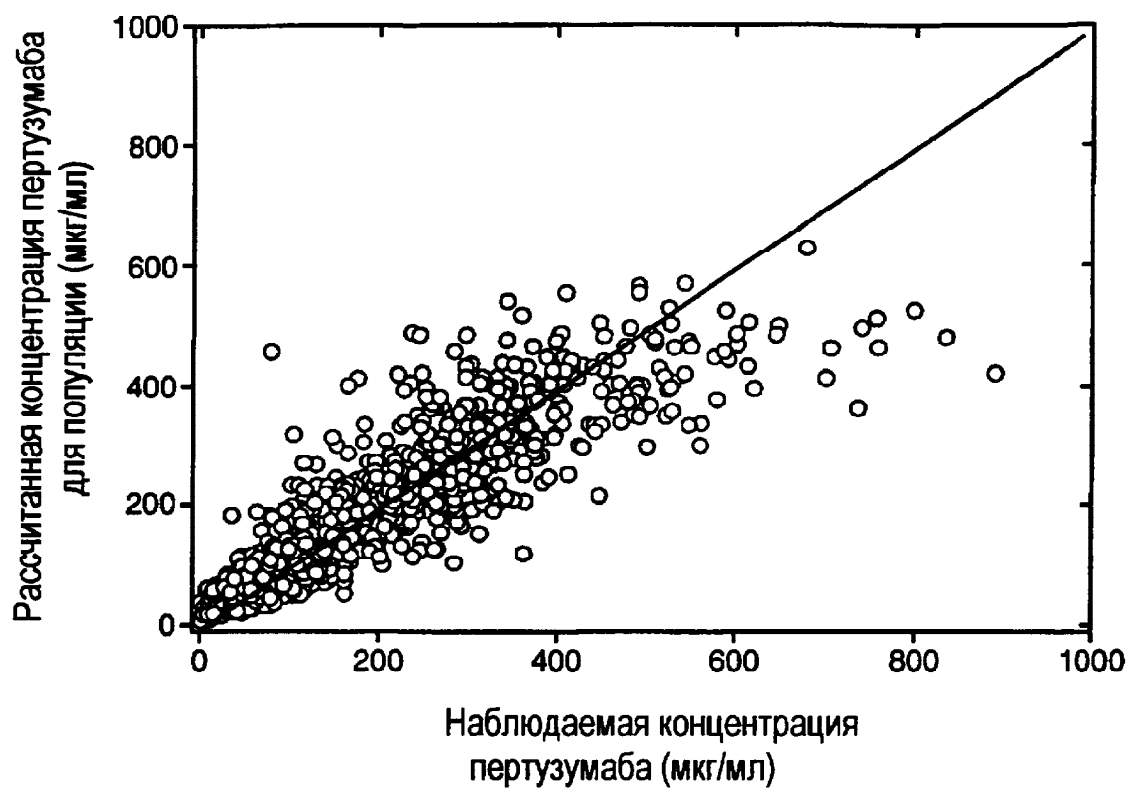
ФИГ. 8В



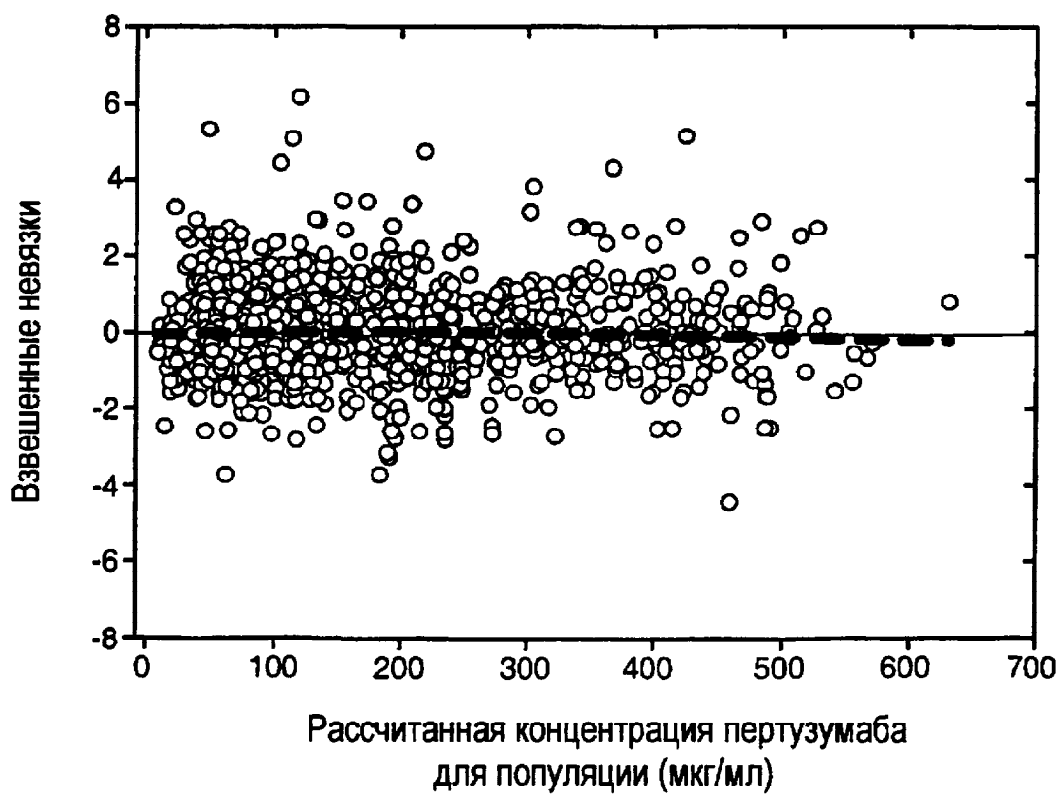
ФИГ. 9А

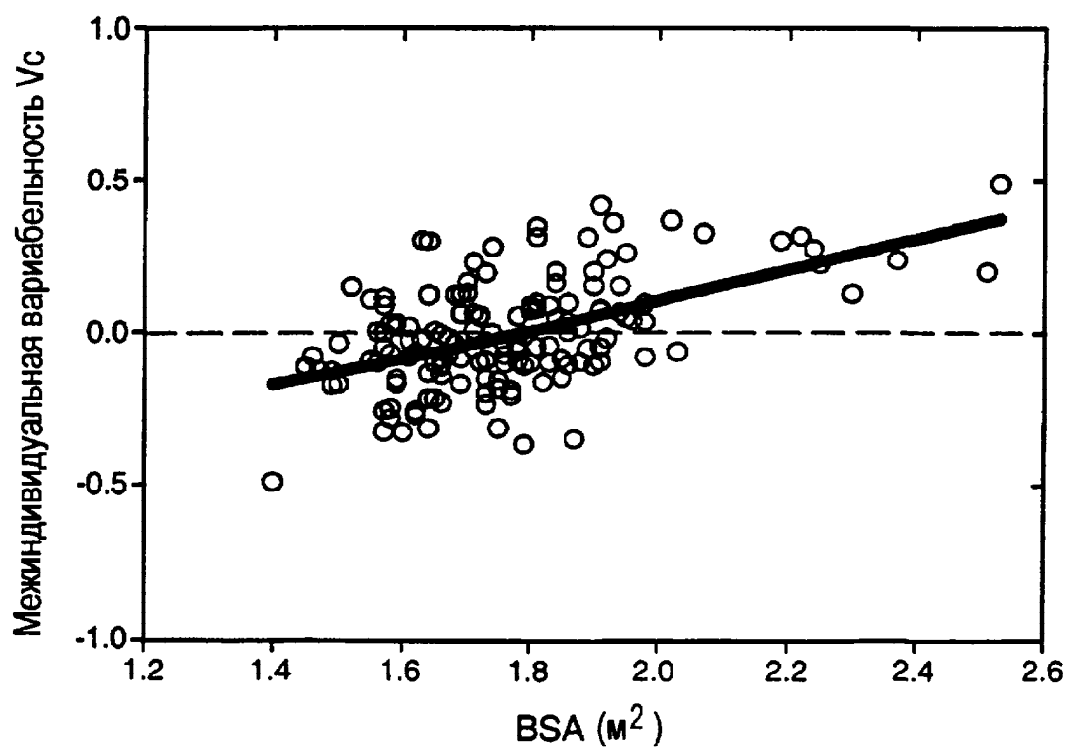
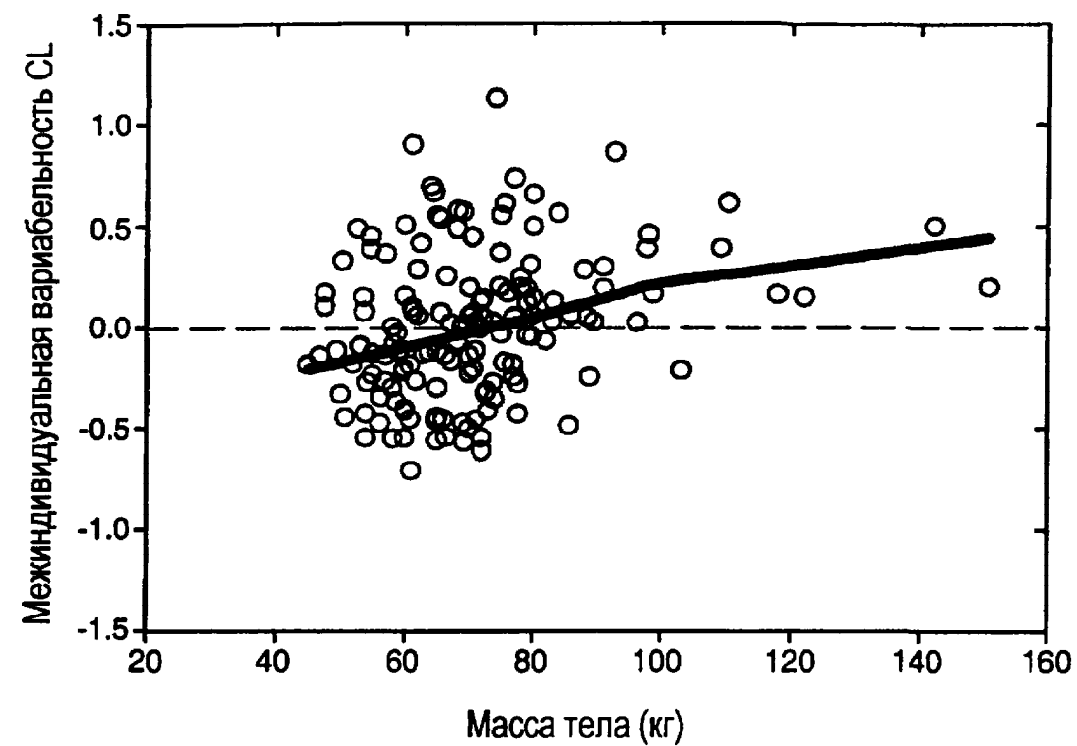


ФИГ. 9В

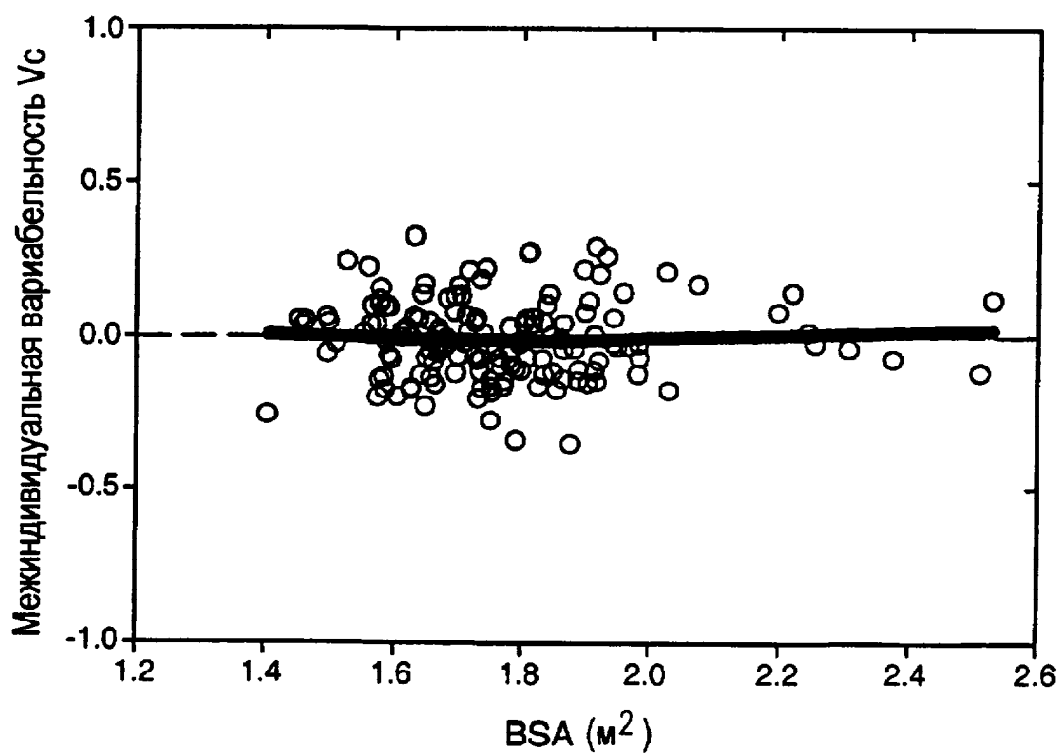
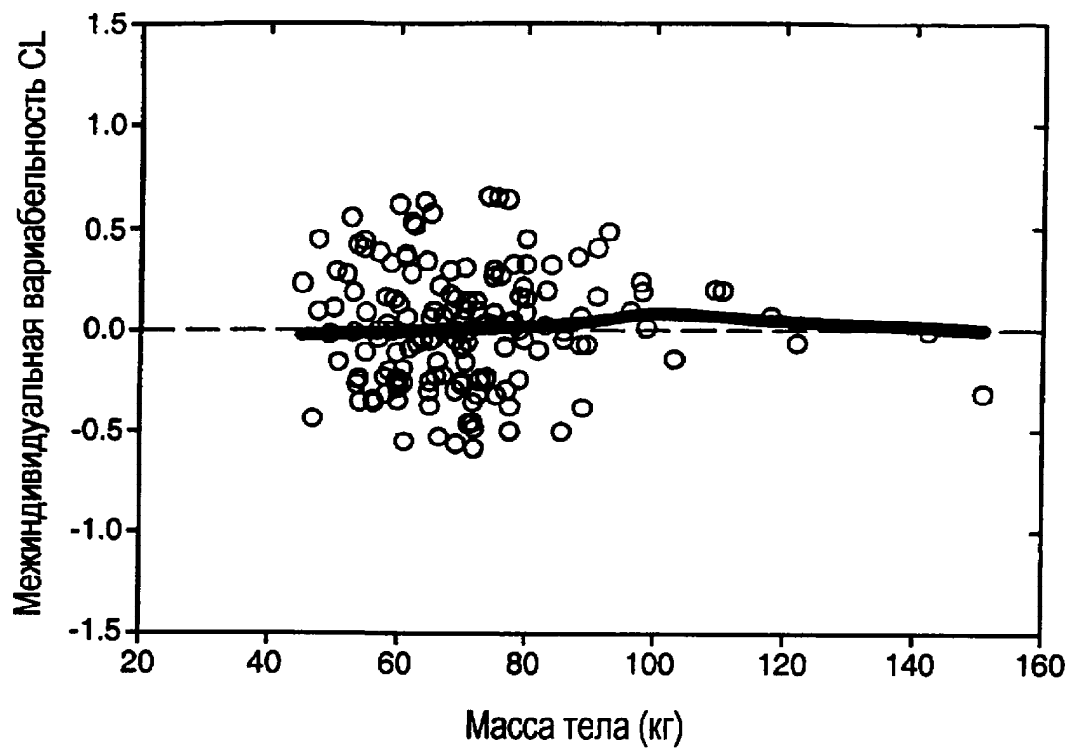


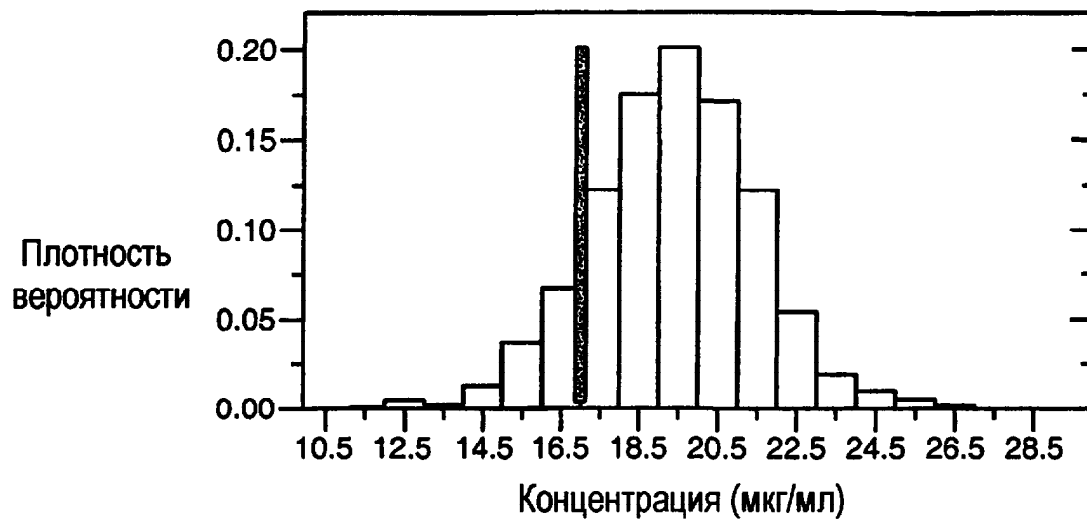
ФИГ. 10А

**ФИГ. 10В**

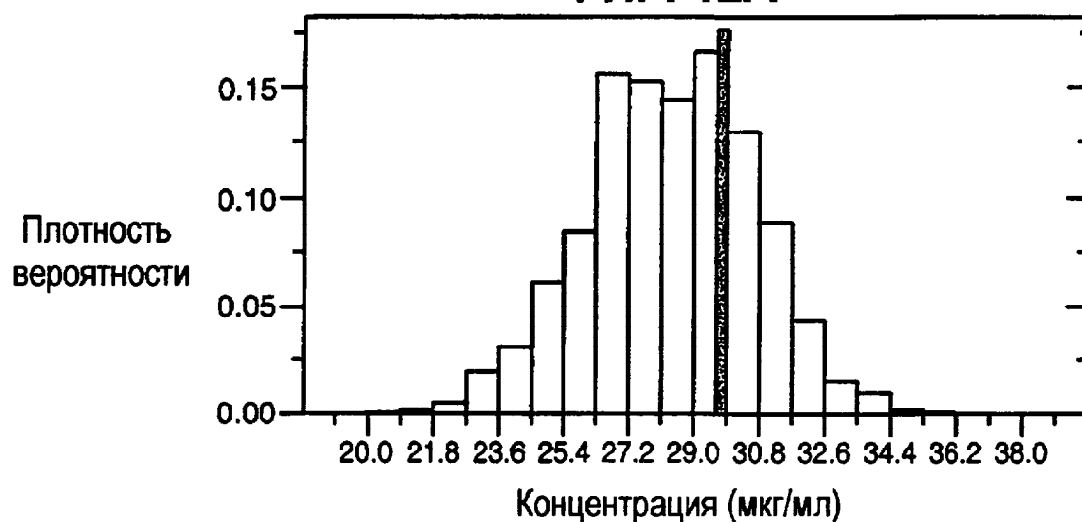


ФИГ. 11А

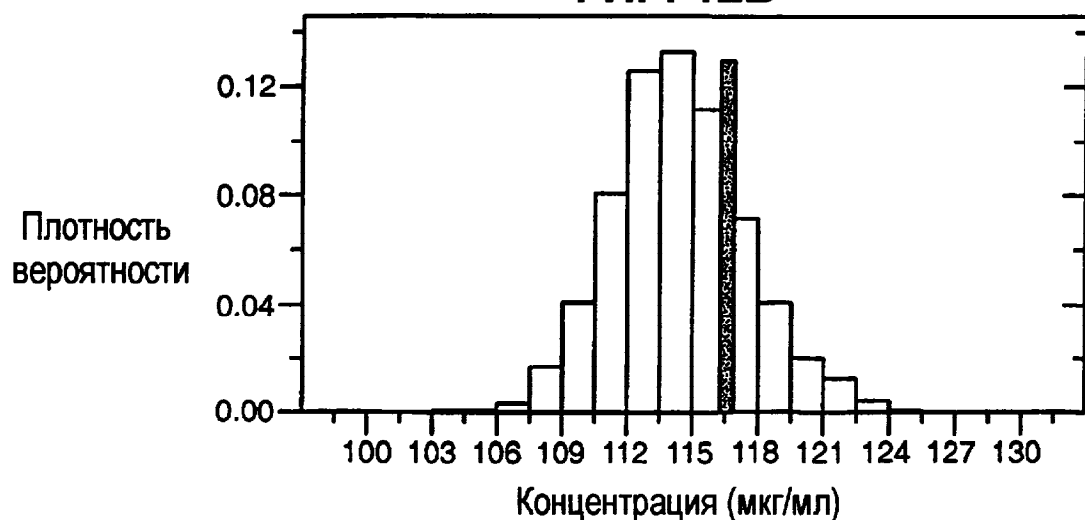
**ФИГ. 11В**



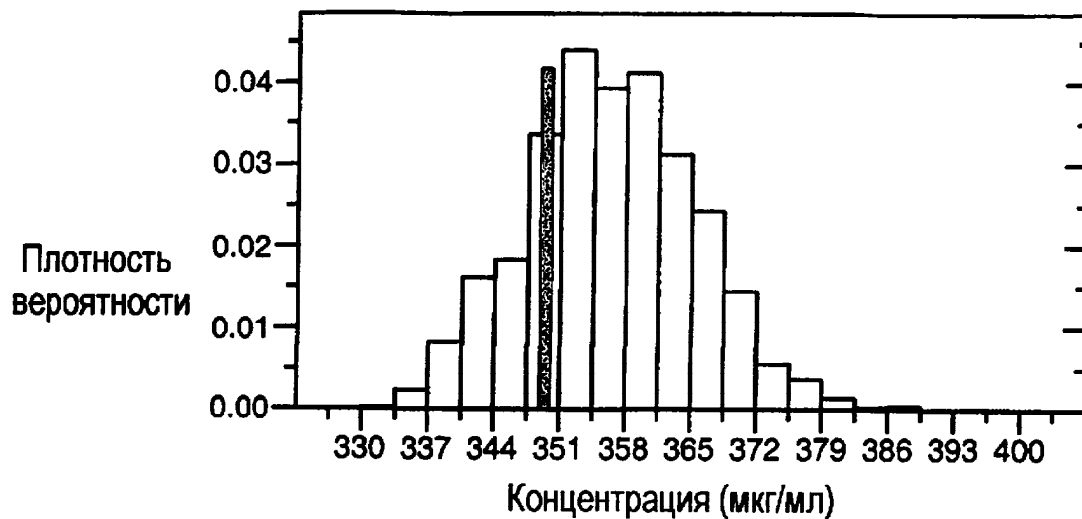
ФИГ. 12А



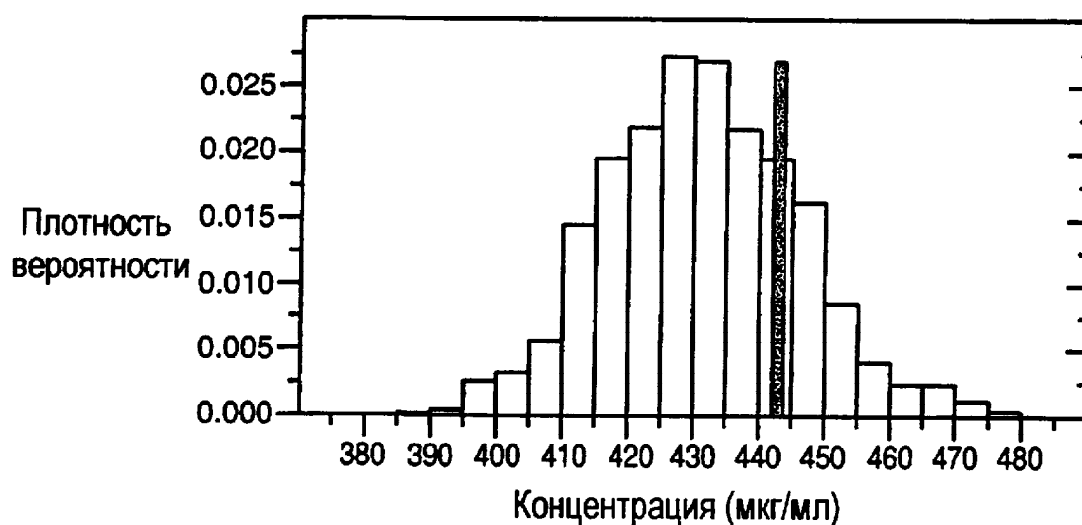
ФИГ. 12В



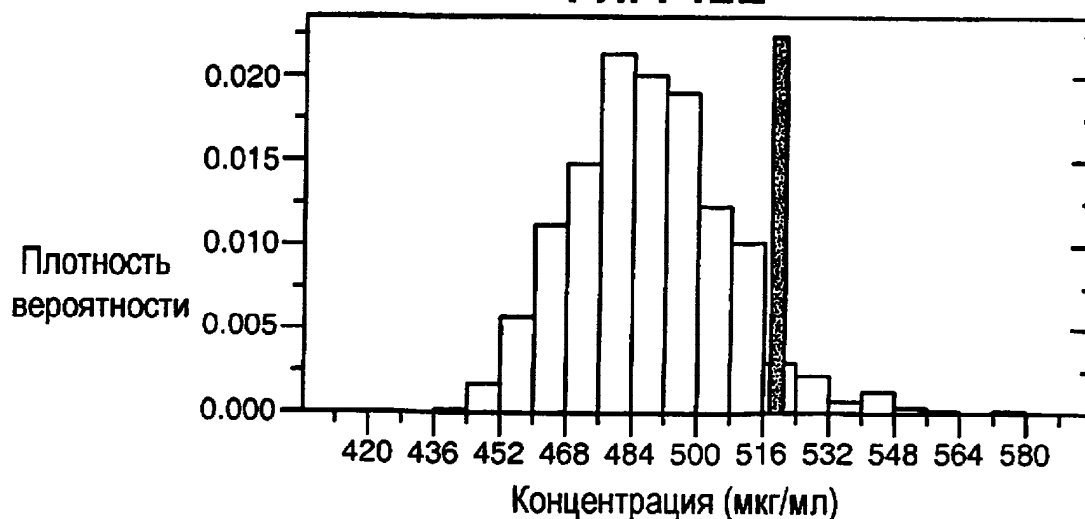
ФИГ. 12С



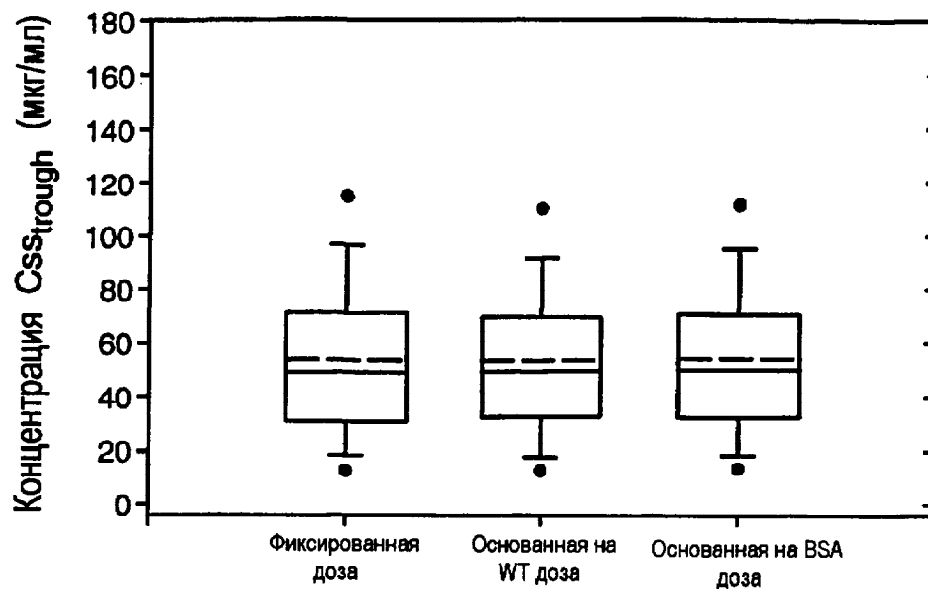
ФИГ. 12D



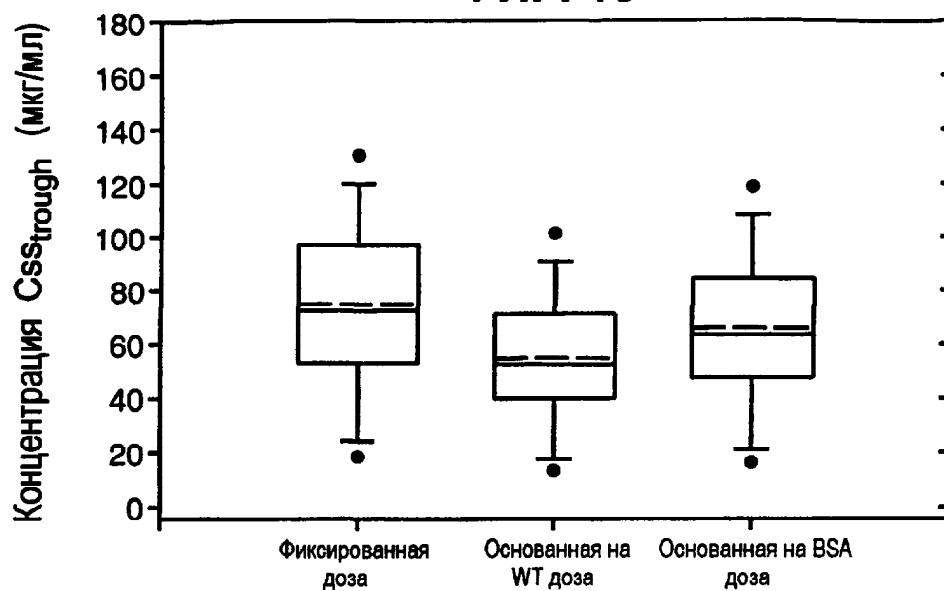
ФИГ. 12E



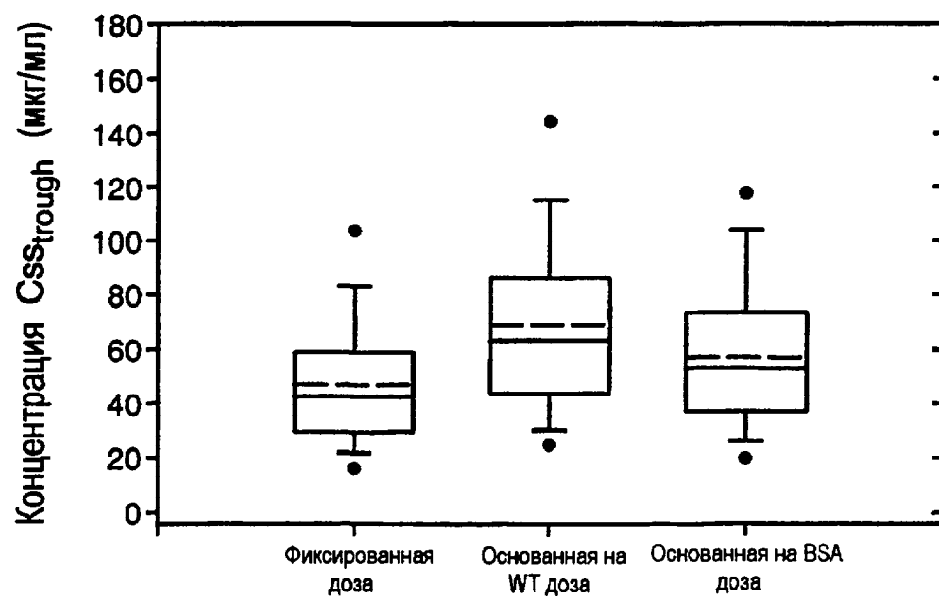
ФИГ. 12F



ФИГ. 13



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В